

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización del papel del dimorfismo y la  
respuesta humoral frente a *Candida albicans* en  
un modelo de colonización gastrointestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Blanca Huertas Capilla**

DIRECTORES

**Jesús Pla Alonso  
Rosalía Díez Orejas**

**Madrid, 2017**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL DIMORFISMO Y  
LA RESPUESTA HUMORAL FRENTE A *Candida*  
*albicans* EN UN MODELO DE COLONIZACIÓN  
GASTROINTESTINAL

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por

BLANCA HUERTAS CAPILLA

DIRECTORES:

DR. JESÚS PLA ALONSO

DRA. ROSALÍA DÍEZ OREJAS



**D<sup>a</sup>. MARÍA GLORIA MOLERO MARTÍN-PORTUGUÉS, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICA:** - Que Dña. BLANCA HUERTAS CAPILLA ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los Dr. D. Jesús Pla Alonso y Dra. Dña. Rosalía Díez Orejas, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia con el título:

**“Caracterización del papel del dimorfismo y la respuesta humoral frente a *Candida albicans* en un modelo de colonización gastrointestinal”**

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2016.

Fdo. Prof. Dra. María Gloria Molero Martín-Portugués





La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- **BIO2009-07788:** Implicación de rutas de transducción de señal mediadas por MAP quinasa en la construcción de la pared celular de *Candida albicans*: relevancia en modelos de comensalismo en ratón.  
**Entidad financiadora:** Ministerio de Educación y Ciencia. Programa Nacional de Biotecnología 2010-2013.
- **BIO2012-31839:** Estudio de la respuesta inmunitaria y la adhesión al epitelio intestinal en un modelo de comensalismo en el hongo patógeno *Candida albicans*.  
**Entidad financiadora:** Ministerio de Educación y Ciencia. Programa Nacional de Biotecnología 2012-2015.

así como a la concesión de las siguientes ayudas:

- **Beca Predoctoral del programa de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.**  
Diciembre 2010 - Diciembre 2014.
- **Ayuda para la realización de Estancias Breves dentro del programa FPI,** concedida para la estancia temporal en el laboratorio de la Dra. Luigina Romani (Universidad de Perugia, Italia) en 2013.



# Agradecimientos

---



Ahora que este largo camino comienza a ver su final, llegó la hora de dar las gracias a todos aquellos que de una forma u otra habéis formado parte de esta dura etapa. Sin vuestra presencia y vuestra ayuda, estos años no habrían sido una experiencia tan especial y este trabajo no sería hoy una realidad.

En primer lugar y en especial, quisiera dar las gracias a mis directores, Jesús y Rosalía. Jesús, gracias por darme la oportunidad de vivir esta aventura, por tu apoyo, tu confianza y tu amistad. Gracias por haberme enseñado tanto y por sacarme una sonrisa hasta en los peores días. Rosalía, gracias por depositar en mí toda tu confianza para llevar a cabo este proyecto y por poner en él todo tu esfuerzo y dedicación. Tu apoyo llegó como caído del cielo y has sido imprescindible durante todo este tiempo. He sido muy afortunada de teneros como directores y ha sido un placer compartir con vosotros estos últimos años tanto en lo profesional como en lo personal.

Elvira, me enseñaste a dar mis primeros pasos en el laboratorio y has sido una parte importantísima de esta experiencia. Gracias por tu amistad, tu autenticidad y sinceridad, y por aportar esa luz a cualquier día de trabajo. Por tus innumerables muestras de cariño y apoyo y por recordarme que siempre volverá a salir el sol. Rebeca, gracias también a ti por estar ahí siempre dispuesta a ayudarnos en todo, por tu amabilidad y cercanía, y por ser un gran ejemplo de dedicación y de compromiso.

Dani, Inês, Carmen y Vero, sois mi segunda familia y el mejor regalo de estos años. Me siento tremendamente afortunada de haber sido la hermana pequeña de este gran equipo. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y por esa infinidad de risas y buenos momentos que jamás podré olvidar. Espero que nos queden muchísimas cosas buenas por vivir juntos. Haber hecho la tesis merece la pena sólo por haberla podido hacer a vuestro lado.

A todos los que alguna vez habéis formado parte de la U2: Carla, Juan, Tamara, Joanna, Ry, Raquel, Cris, Irene, César, Bárbara, Eva... Ha sido un placer conocerlos y trabajar con vosotros.

Gracias a todos los profesores del departamento de Microbiología II por ser tan cercanos y por estar siempre dispuestos a ayudarnos y en especial a todos con los que he tenido la oportunidad de participar en las clases prácticas. A todos los miembros de la U1, mi unidad adoptiva. Aída, eres un pilar fundamental de este trabajo y para mí ha sido todo un honor trabajar contigo. Gracias por tu esfuerzo y sobre todo por todo tu cariño, eres genial. Ana, mi gran amiga en los últimos doce años tanto dentro como fuera del

laboratorio. Eres uno de los grandes regalos que Madrid me tenía reservado y sé que la distancia no va a poder con eso. A todos mis compañeros del departamento: Andrea, Ahmad, Jose, Raúl, Sonia, María... Gracias a Belén y a Tere por tener siempre palabras de ánimo y tranquilidad (todo llega, todo pasa...). A Benito y José Alberto, mil gracias por vuestra ayuda y porque conseguís sacar siempre lo mejor de todos nosotros y alegrarnos cada día de trabajo.

Quisiera agradecer a la Profesora Luigina Romani por darme la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio en la Universidad de Perugia, y a todos los que formaron parte de esta aventura por intentar hacerme sentir como en casa.

A mis “*biotechs*” Salo, Dafne, Judit, Pili y Patri, por seguir estando siempre ahí. A Inma, Belén y María, mis mejores amigas. Gracias por todas las alegrías y buenos momentos y por levantarme cada vez que me caía. Es un privilegio teneros a mi lado. A Curro y Mery, por todos los momentazos vividos y por vivir, y a mis lucentinas de siempre, porque a pesar de la distancia aún son muchas las bodas, despedidas y bautizos por celebrar.

Gracias a mis padres, a Alberto y a Dani, por su apoyo incondicional desde siempre y en todo, por mantenerme a flote durante este largo recorrido y por comprenderme mejor que nadie. Os quiero con locura y sois mi mayor tesoro.

Mil gracias a todos por vuestro apoyo y cariño. Esta tesis es de todos vosotros.







<b>Abreviaturas.....</b>	<b>15 -</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>19 -</b>
<b>Summary .....</b>	<b>27 -</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>33 -</b>
1. <i>C. albicans</i> como modelo de hongo patógeno oportunista.....	35
A. Generalidades .....	35
B. La pared celular de <i>C. albicans</i> .....	36
C. Requisitos nutricionales y condiciones de crecimiento.....	37
D. Rutas que regulan la adaptación al medio .....	39
E. Mecanismos de regulación de la morfología en <i>C. albicans</i> .....	43
F. Herramientas genéticas.....	51
2. Estudio de la interacción <i>C. albicans</i> - hospedador.....	55
A. Factores de virulencia .....	55
B. Modelos animales.....	56
C. Respuesta inmunitaria.....	59
D. La proteómica como herramienta en el estudio de enfermedades infecciosas ....	65
<b>Objetivos .....</b>	<b>69 -</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>73 -</b>
1. Obtención y caracterización <i>in vitro</i> de una cepa de <i>Candida albicans</i> de filamentación regulada .....	75
A. Obtención de cepas de <i>C. albicans</i> de filamentación regulada .....	75
B. Caracterización <i>in vitro</i> de la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> .....	86
2. Estudio del papel del dimorfismo en la interacción de <i>C. albicans</i> con el hospedador .....	97
A. Interacción con células fagocíticas.....	97
B. Estudio del dimorfismo en la colonización intestinal.....	101
C. Estudio del papel del dimorfismo durante el curso de una infección sistémica .	111
3. Estudio de la respuesta humoral frente a <i>Candida albicans</i> en modelos de colonización e infección .....	116
A. Obtención de una cepa de <i>Candida albicans</i> (CAF2-OVA) que expresa un antígeno modelo.....	116

B. Caracterización de los diferentes modelos murinos.....	117
C. Análisis inmunoproteómico de la respuesta humoral.....	122
D. Estudio de la capacidad protectora de la colonización gastrointestinal frente a una infección sistémica letal.....	132
<b>Discusión.....</b>	<b>135 -</b>
A. Papel del gen <i>TUP1</i> en la interacción de <i>C. albicans</i> con el hospedador.....	137
B. Papel del dimorfismo en la respuesta inmunitaria.....	150
<b>Conclusiones .....</b>	<b>157 -</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>161 -</b>
1. Tipos celulares .....	163
A. Microorganismos .....	163
B. Líneas celulares.....	164
2. Animales de experimentación.....	164
3. Manipulación de estirpes celulares.....	164
A. Microorganismos .....	164
B. Líneas celulares.....	168
4. Técnicas de Biología Molecular y Manipulación de DNA.....	169
A. RT-PCR .....	170
B. Plásmidos y oligonucleótidos empleados .....	170
C. Descripción del sistema de regulación por tetraciclina .....	171
5. Manipulación de Proteínas y Técnicas Inmunológicas .....	173
A. Sistema monodimensional.....	173
B. Sistema bidimensional.....	175
C. Titulación de anticuerpos por ELISA.....	176
6. Ensayos en animales .....	177
A. Ensayos de colonización .....	177
B. Ensayos de infección sistémica .....	179
7. Técnicas de microscopía y citometría de flujo .....	180
A. Microscopía óptica.....	180
B. Microscopía de fluorescencia .....	180
8. Soporte bioinformático.....	180
<b>Listado de Figuras y Tablas.....</b>	<b>183 -</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>189 -</b>

## Abreviaturas

---



<b>μL</b> -	Micro litro	<b>MLN</b>	Ganglio linfático mesentérico
<b>2DE</b> -	Electroforesis bidimensional	<b>mM</b>	Milimolar
<b>aCT</b> -	Clortetraciclina autoclavada	<b>MOI</b>	Multiplicity of infection
<b>AMPc</b>	Adenosin-monofosfato cíclico	<b>NKT</b>	Células T <i>natural killer</i>
<b>ATCC</b> -	<i>American Type Culture Collection</i>	<b>OPC</b>	Candidiasis oro-faríngea
<b>CFUs</b> -	Unidades formadoras de colonia	<b>OPD</b>	o-fenilendiamina
<b>CHAPS</b> -	3-(cloro amido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfonato	<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>CMC</b> -	Candidiasis crónica en mucosa	<b>PAK</b>	Quinasa asociada a p21
<b>CWP</b> -	Proteína de pared celular	<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>D.O.</b>	Densidad óptica	<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>DCs</b>	Células dendríticas	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico	<b>PDA</b>	Diacrilamida de piperazina
<b>Dox</b>	Doxiciclina	<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>DTE</b>	Ditrioeritritol	<b>PMSF</b>	Fluoruro de metilfenilsulfonilo
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>FBS</b> -	Suero fetal bovino	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>FP</b> -	Proteína fluorescente	<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>g</b> -	Gramo	<b>RT-PCR</b>	PCR a tiempo real
<b>GlcNAc</b> -	N-acetilglucosamina	<b>SAP</b>	Aspartil proteasa secretada
<b>GPI</b> -	Glicosil-fosfatidil-inositol	<b>SD</b>	Medio sintético dextrosa
<b>HSG</b> -	<i>Hypha-specific genes</i>	<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>ID</b> -	Intestino delgado	<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>IFN-γ</b> -	Interferón gamma	<b>SERPA</b>	<i>Serological Proteome Analysis</i>
<b>IG</b> -	Intestino grueso	<b>t</b>	Tiempo
<b>IPG</b> -	Gradiente de pH inmovilizado	<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Kb</b> -	Kilopares de bases	<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>KO</b> -	<i>Knockout</i>	<b>T<sub>reg</sub></b>	Linfocitos T reguladores
<b>LTi</b> -	Células inductoras de tejido linfoide	<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>M</b> -	Molar	<b>V</b>	Voltios
<b>MAP</b> -	Proteína activada por mitógenos	<b>wt</b>	Cepa silvestre
<b>MAPK</b> -	Proteína quinasa activada por mitógenos	<b>YPD</b>	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
<b>MAPKK</b> -	Quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos	<b>Δ</b>	Deleción
<b>MAPKKK</b> -	Quinasa de la quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos		
<b>mg/mL</b> -	Miligramo/mililitro		
<b>min</b> -	Minutos		
<b>mL</b> -	Mililitro		



# Resumen

---





## CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL DIMORFISMO Y LA RESPUESTA HUMORAL FRENTE A *Candida albicans* EN UN MODELO DE COLONIZACIÓN GASTROINTESTINAL

### Introducción

Las infecciones fúngicas representan en la actualidad un problema sanitario de difícil control. El conocimiento de los factores de virulencia de los hongos patógenos que causan enfermedad es de especial relevancia en el tratamiento de candidiasis así como en el diagnóstico de las mismas. *Candida albicans* continúa siendo la especie patógena más prevalente, debido principalmente a su presencia como microorganismo de tipo comensal en el tracto gastrointestinal y urogenital y en la cavidad oral del ser humano. En situaciones de alteración del sistema inmunológico, *C. albicans* es capaz de diseminarse al torrente sanguíneo, pudiendo llegar a órganos internos causando infecciones sistémicas. Es por ello que se trata de un hongo patógeno oportunista.

Uno de los aspectos más característicos de este hongo es su capacidad de presentar varias morfologías llevando a cabo la llamada transición dimórfica. Así, *C. albicans* puede crecer formando blastosporas, hifas, pseudohifas y clamidosporas en respuesta a determinados estímulos nutricionales y ambientales. Dicha transición dimórfica está estrechamente relacionada con sus factores de virulencia, así como en la modulación de la respuesta inmunitaria generada por el hospedador. La relación entre la filamentación y la patogenicidad de *C. albicans* ha sido ampliamente estudiada, mientras que las implicaciones de esta transición en su papel como comensal en el interior del tracto gastrointestinal no se conocen con precisión.

### Objetivos

1. Obtener una cepa de *C. albicans* de filamentación controlada haciendo uso del sistema de regulación por tetraciclina.
2. Caracterización *in vitro* de dicha cepa, analizando la implicación de la filamentación en su crecimiento, morfología, sensibilidad frente a determinados agentes, capacidad de adhesión e interacción con células fagocíticas.
3. Análisis de las implicaciones de la filamentación *in vivo* en un modelo de colonización gastrointestinal y en un modelo de infección sistémica.
4. Estudio de la respuesta humoral generada por *C. albicans* en modelos de colonización e infección y estudio del posible papel protector de la respuesta producida en ambos modelos.

### Resultados

1. Obtención y caracterización de una cepa de *C. albicans* de filamentación controlada

El primer objetivo de este trabajo fue la obtención de una cepa mutante cuya filamentación pudiese ser controlada de manera externa. Para ello, nos planteamos usar el sistema de inducción/represión por tetraciclina (TET-ON/OFF), ampliamente utilizado en nuestro grupo de investigación. Al mismo tiempo, decidimos emplear dicho sistema sobre el gen

*TUP1*, descrito previamente como regulador negativo de la filamentación en *C. albicans*. Tras obtener construcciones genéticas en las que la expresión de *TUP1* era controlada por el promotor de tetraciclina (tanto en su versión inducible como reprimible por el antibiótico), se obtuvieron las respectivas cepas condicionales *TUP1*<sup>IND</sup> y *TUP1*<sup>REP</sup>. La transición dimórfica es controlada eficientemente en ambos mutantes mediante la adición de doxiciclina al medio de cultivo. La cepa *TUP1*<sup>IND</sup> presenta un fenotipo filamentoso debido a la represión constitutiva de la expresión de *TUP1*, mientras que la presencia de doxiciclina induce la expresión de éste, lo que conlleva un crecimiento con morfología levaduriforme. De manera inversa, la cepa *TUP1*<sup>REP</sup> presenta una morfología levaduriforme en condiciones estándar, mientras que la adición del antibiótico, al reprimir *TUP1*, desencadena un crecimiento filamentoso. Sin embargo, la eficiencia de la versión reprimible (*TUP1*<sup>REP</sup>) es significativamente mayor que la inducible, dado que la concentración de doxiciclina necesaria para la eficiencia del sistema es considerablemente menor. Debido a la mayor sensibilidad de la versión reprimible, la cepa *TUP1*<sup>REP</sup> fue marcada con la proteína fluorescente roja (RFP) y empleada a lo largo del trabajo para el estudio del dimorfismo. Como sustitución a la doxiciclina, y con el objetivo de optimizar el uso del sistema de regulación *in vivo*, nos planteamos emplear la clortetraciclina autoclavada (aCT) en la modulación de la expresión de *TUP1*. La aCT presenta una eficiencia similar a la de la doxiciclina en la regulación del promotor TET, sin embargo su actividad antibiótica es significativamente menor.

En la caracterización de la cepa *TUP1*<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, hemos comprobado que su crecimiento en medio líquido en condiciones estándar es ligeramente inferior al de una cepa silvestre CAF2. Sin embargo, la inducción de la filamentación en presencia de aCT no parece producir alteraciones en su crecimiento tanto en medio líquido como sólido. La pared celular de este mutante experimenta ciertos cambios al inducir su filamentación con aCT. La forma filamentosa es más resistente a agentes que alteran la pared celular como rojo Congo o blanco de calcoflúor lo que sugiere alteraciones en la pared celular, bien en la síntesis de quitina, de  $\beta$ -(1,3)-glucano o de otros componentes. Por otro lado, la filamentación provoca un aumento en la sensibilidad a determinados antifúngicos, como miconazol, fluconazol y anfotericina B, lo que podría deberse a una relación entre la regulación de *Tup1* y la biosíntesis de ergosterol. El aumento en la sensibilidad a SDS indica que la filamentación también conlleva cambios en la permeabilidad de la membrana.

Para analizar las implicaciones de la filamentación en la capacidad de adhesión de la cepa *TUP1*<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> se llevaron a cabo experimentos tanto *in vitro* como *ex vivo*. La inducción de la filamentación en presencia de aCT se tradujo en una disminución en su capacidad de adherirse a epitelio intestinal en un modelo de adhesión *ex vivo*. Esta disminución fue aún más significativa en un modelo de adhesión a poliestireno *in vitro*.

Como parte de la caracterización de este mutante, se estudió su interacción con células fagocíticas, analizando la actividad fagocítica y fungicida de neutrófilos peritoneales y macrófagos. La inducción de la filamentación no altera los porcentajes de fagocitosis de ambos tipos celulares, sin embargo sí afecta a la supervivencia del mutante; la forma

filamentosa presenta menor susceptibilidad y como consecuencia su supervivencia es mayor. El análisis de los niveles de citoquinas producidas por neutrófilos mediante RT-PCR reveló que la filamentación no altera los niveles de las citoquinas IL-6 e IL-10, mientras que provoca un ligero aumento en los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  e IL-22, siendo más significativo en la IL-17A.

## 2. Análisis de la implicación de la filamentación de la cepa en la colonización gastrointestinal y la infección sistémica

El empleo de aCT como antibiótico regulador de la expresión de *TUP1* se validó para su posterior uso *in vivo*. La administración oral de aCT a una concentración 1 mg/mL en el agua de bebida de ratones colonizados por *C. albicans* es suficiente para inducir o reprimir el promotor TET con eficiencia en el interior del tracto gastrointestinal. La concentración de aCT en el intestino de ratones tratados con esta agua de bebida es suficiente para inducir la filamentación en la cepa *TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>*. Dicha administración oral también conlleva la absorción del antibiótico a órganos como cerebro, hígado, riñones y bazo en una concentración suficiente para inducir la filamentación del mutante.

Los ensayos de colonización intestinal realizados permitieron confirmar la relación directa entre la filamentación de la cepa y la disminución en su capacidad de colonizar el intestino. En ausencia de aCT, el mutante es capaz de establecerse en el intestino y de mantener unos valores de colonización constantes a lo largo del tiempo. En cambio, el tratamiento con aCT en agua de bebida provoca una disminución progresiva de los valores de alojamiento en heces, llegando a perderse su detección. Mediante el análisis de cortes histológicos de la región del colon, comprobamos que esta pérdida progresiva debida a la filamentación origina un daño significativo en el colon de los ratones colonizados. Esta inducción de la filamentación modifica el tipo de respuesta adaptativa que se genera en el intestino, ya que la forma filamentosa aumenta la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17A, citoquinas relacionadas con la respuesta de inflamatoria de tipo  $T_H1/T_H17$ .

En el estudio de las implicaciones de la filamentación en la virulencia del mutante, se llevaron a cabo varios experimentos de infección sistémica. La cepa *TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>* presenta una virulencia atenuada tanto en presencia como en ausencia del antibiótico, dando lugar a una infección crónica y no letal. La inducción del crecimiento filamentoso disminuye significativamente el alojamiento del hongo en riñones, los principales órganos diana durante la infección sistémica. Estos datos sugieren una menor capacidad de invasión de la forma filamentosa.

## 3. Estudio de la respuesta humoral frente a una colonización de *C. albicans* en ratón

Con el propósito de estudiar la respuesta inmunitaria de tipo humoral generada en una colonización de *C. albicans*, se emplearon tres modelos murinos: colonización gastrointestinal (C), infección sistémica (I) y colonización seguida de infección (C+I). A lo largo de cada ensayo, se tomaron muestras de sangre en distintos puntos del tiempo para analizar la evolución de la respuesta mediada por anticuerpos mediante técnicas proteómicas. La titulación de los sueros obtenidos mediante ELISA reveló unos niveles de

anticuerpos mayores en colonización que en infección sistémica, mientras que los niveles más altos fueron observados en el modelo C+I.

A través de un análisis de tipo SERPA (*Serological Proteome Analysis*) se han detectado e identificado las proteínas inmunogénicas de cada uno de los modelos. Se ha definido un patrón diferencial de anticuerpos en los sueros de los ratones colonizados, infectados y C+I. De esta forma, se han identificado anticuerpos producidos únicamente en la etapa más tardía de la colonización, así como anticuerpos específicos de cada modelo.

Debido a estudios previos en los que se mostraba el papel protector de algunos anticuerpos frente a candidiasis, nos planteamos analizar la posible protección que presentan aquellos anticuerpos generados durante la colonización frente a una infección sistémica posterior. Los datos muestran que los ratones previamente colonizados con *C. albicans* presentan una mayor supervivencia ante una posterior infección. Por ello, podemos concluir que la respuesta humoral generada durante una colonización intestinal confiere una protección parcial frente a la infección sistémica.

### **Conclusiones**

1. La obtención de una cepa de *Candida albicans* en la que la expresión del regulador transcripcional *TUP1* depende del sistema de expresión TET es una herramienta eficaz para estudiar el crecimiento filamentoso de este hongo, tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. El empleo de clortetraciclina autoclavada (aCT) como sustitución de la doxiciclina en estudios de patogénesis fúngica, mantiene la eficiencia y añade versatilidad al sistema de regulación mediado por tetraciclina para estudios *in vivo*. La administración oral de aCT en ratones permite regular eficazmente la morfología celular de la cepa durante el curso tanto de una colonización como de una infección sistémica.
3. La inducción del crecimiento filamentoso en *C. albicans* por represión de la expresión de *TUP1* genera cambios en la composición de la pared y la membrana celular del hongo que se reflejan en una diferente sensibilidad a determinados antifúngicos y compuestos que dañan dichas estructuras.
4. La inducción de la filamentación por represión del regulador *TUP1* provoca una disminución en la capacidad de adhesión *in vitro* y *ex vivo*, una mayor resistencia ante la actividad fungicida de neutrófilos y macrófagos murinos y un aumento de la producción de IL-17A por parte de neutrófilos.
5. La inducción de la filamentación por represión del regulador *TUP1* provoca la reducción o la eliminación de la tasa de colonización fúngica, dependiendo de si ésta se produce al inicio o tras el establecimiento de la colonización gastrointestinal en ratones C57BL/6. Dicho crecimiento filamentoso causa un aumento significativo en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-17A en el colon de ratones colonizados.

6. El análisis de la composición de suero obtenido durante la colonización gastrointestinal en ratones C57BL/6 revela la presencia de una fuerte respuesta inmunitaria humoral, con la elevación y mantenimiento de anticuerpos frente a las proteínas Eno1, Met6, Hsp70, Pgk1 y Pdc11 desde el comienzo de la colonización así como frente a la proteína Hxk2 a tiempos largos, el mantenimiento de títulos bajos frente a la chaperona Hsp90 y la aparición tardía de anticuerpos frente a las proteínas Cdc19 y Asc1.
7. El patrón diferencial de anticuerpos detectado por SERPA pone de manifiesto la capacidad del sistema inmunitario para diferenciar entre colonización intestinal e infección sistémica. Ambos modelos sólo comparten algunos anticuerpos frente a enzimas glicolíticas, metabólicas como Eno1, Pgk1 y Pdc11; así como dos proteínas de la familia de Hsp70.
8. La colonización del tracto gastrointestinal por *C. albicans* en ratones C57BL/6 protege parcialmente frente a una infección letal posterior en el modelo de infección sistémica, sugiriendo que durante la colonización se desarrolla una respuesta inmunitaria protectora.



## Summary

---





## CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF DIMORPHISM AND HUMORAL RESPONSE AGAINST *Candida albicans* IN A MODEL OF GASTROINTESTINAL COLONIZATION

### **Introduction**

Fungal infections currently represent a health problem hard to control. Knowledge of virulence factors of pathogenic fungi that cause disease is especially important in the treatment of candidiasis and its diagnosis. *Candida albicans* remains the most prevalent pathogenic species, mainly due to its presence as commensal microorganism type in the gastrointestinal and urogenital tract and in the oral cavity of the human being. In situations of impaired immune system, *C. albicans* can disseminate to the bloodstream and can infect internal organs causing systemic infections. That is why it is considered an opportunistic fungal pathogen.

One of the most characteristic aspects of this fungus is its ability to present several morphologies carrying out the dimorphic transition. Thus, *C. albicans* can grow forming blastospores, true hyphae, pseudohyphae and chlamydospores in response to specific nutritional and environmental stimuli. This dimorphic transition is closely related to virulence factors and to the modulation of immune response generated by the host. The relationship between filamentation and pathogenicity of *C. albicans* has been widely studied, while the implications of this transition in its role as a commensal inside the gastrointestinal tract is not clearly known.

### **Objectives**

1. Get a *C. albicans* strain which dimorphic transition can be modulated externally using the tetracycline-regulatable system.
2. *In vitro* characterization of this strain by analyzing the hyphal growth, susceptibility to certain drugs, adhesion ability and interaction with phagocytic cells.
3. Analyse the dimorphic transition and its implications in *in vivo* models of gastrointestinal colonization and systemic infection.
4. Study of the humoral response caused by *C. albicans* colonization and infection models and study of the protective role of the response produced in both models.

### **Results**

#### 1. Characterization of a controlled filamentation strain of *C. albicans*

The first objective of this work was to obtain a mutant strain whose filamentation could be controlled externally. To achieve this, we used the tetracycline regulated system (TET-ON / OFF), commonly used in our research group. At the same time, we decided to use this system with Tup1 gene, previously described as a negative repressor of filamentation in *C. albicans*.

After obtaining genetic constructs in which *TUP1* was placed under the tetracycline promoter (both versions: repressed and induced by the antibiotic), we obtained the respective conditional TUP1<sup>IND</sup> and TUP1<sup>REP</sup> strains. The dimorphic transition is controlled efficiently in both mutants by adding doxycycline to the culture medium. TUP1<sup>IND</sup> strain

presents a filamentous phenotype due to the constitutive repression of *TUP1*, while the presence of doxycycline induces its expression, which carries a hyphal morphology.

However, *TUP1<sup>REP</sup>* strain has a yeast morphology under standard conditions, while the addition of antibiotic represses *TUP1* expression and drives a filamentous growth. The efficiency of the repressible version (*TUP1<sup>REP</sup>*) is significantly higher than the inducible one, since the doxycycline concentration necessary for system efficiency is considerably lower. Because of the increased sensitivity of the repressible version, the *TUP1<sup>REP</sup>* strain was labeled with red fluorescent protein (RFP) and used throughout the work for studying dimorphism. As a replacement to doxycycline and in order to optimize the use of the regulatory system *in vivo*, we started to use the autoclaved chlortetracycline (aCT) in modulating *TUP1* expression. The aCT has a similar efficiency in regulating the TET promoter activity and its antibiotic activity is significantly lower.

The *TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>* strain growth in liquid medium under standard conditions is slightly lower than the wild type strain CAF2. However, induction of filamentation in the presence of aCT does not appear to affect its growth in both liquid and solid medium. The cell wall of this mutant undergoes certain changes during its filamentation with aCT. The filamentous form is more resistant to agents that interferes with the correct assembly of the cell wall, like Congo red or calcofluor white, suggesting certain changes in the cell wall or in the synthesis of chitin,  $\beta$ -(1,3)-glucan or other components. Furthermore, filamentation causes an increase in the sensitivity to several antifungals such as miconazole, fluconazole and amphotericin B, which could be due to a relation between regulation of Tup1 and ergosterol biosynthesis. The increased sensitivity to SDS during filamentation also indicates that this mechanism involves some changes in membrane permeability.

To analyze the implications of filamentation in the adhesion of the strain *TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>* we did both *in vitro* and *ex vivo* experiments. The induction of dimorphic transition in the presence of aCT resulted in a decrease in their ability to adhere to intestinal epithelia in an *ex vivo* model. This decrease was even more significant in an *in vitro* model of adhesion to plastic surfaces.

As a relevant part of the characterization of this conditional strain, its interaction with phagocytic cells was studied by analyzing the phagocytic and fungicidal activity showed by peritoneal neutrophils and macrophages. The induction of dimorphic transition did not alter the percentage of phagocytosis of both cell types, however does affect the survival of this mutant; hyphal form showed a reduced susceptibility and consequently their survival is higher. The analysis of the cytokines profile produced by neutrophils by RT-PCR revealed that filamentation did not affect levels of IL-6 and IL-10, while it causes a slight increase in levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and IL-22, being more emphasized in IL-17A.

## 2. Analysis of the involvement of dimorphic transition in gastrointestinal colonization and systemic infection

The use of aCT as a regulator in *TUP1* expression was validated for use in subsequent *in vivo* experiments. Oral administration of 1 mg/ml aCT in the drinking water of mice

colonized by *C. albicans* is enough to efficiently induce or repress the TET promoter within the gastrointestinal tract. aCT concentration in the intestine of mice treated with this drinking water is also enough to induce the dimorphic transition of TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> strain. This oral treatment also involves uptake of aCT to target organs such as brain, liver, kidneys and spleen in a concentration enough to induce filamentation in our mutant.

We tested several colonization assays to test the relationship between filamentation and the ability to colonize the intestinal tract. The results showed that filamentous growth causes a decrease in the ability to colonize the intestine. In the absence of aCT, the mutant is able to establish itself in the tract and maintain a continuous colonization. In contrast, treatment with aCT in the drinking water causes a progressive decrease in the stools, until we lose its detection. Through analysis of histological sections of the colon region, we found that this progressive loss due to filamentation causes a significant damage in the colon of colonized mice. The dimorphic transition also alters the type of adaptive response developed in the intestinal tract, as the hyphal form increases the production of IFN- $\gamma$  and IL-17A, cytokines involved in the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 response.

We did several experiments of systemic infection to study the implications of filamentation in the virulence of our conditional mutant. The TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> strain showed an attenuated virulence both in the presence and absence of the antibiotic, resulting in a chronic non-lethal infection. Induction of filamentous growth significantly decreases fungal burden values in kidneys, the main target organs during systemic infection. These data suggest a less invasiveness of filamentous form.

### 3. Study of the humoral response to colonization in *C. albicans*

In order to study the humoral immune response developed during a colonization of *C. albicans*, we used three murine models: gastrointestinal colonization (C), systemic infection (I) and colonization followed by infection (C + I). During each model, blood samples were taken at different time points to analyze the evolution of antibody-mediated response by proteomic techniques. Sera titration, measured by ELISA, showed higher levels of antibodies in colonization than in systemic infection, while the highest levels were observed in C + I model.

Through SERPA (Serological Proteome Analysis) we were able to detect and identify several immunogenic proteins of each model. We defined a differential pattern of antibodies in the sera of mice colonized, infected and C + I. Thus, we also identified some antibodies produced only in the late stage of colonization and also specific antibodies for each model.

Because of previous studies which demonstrated the protective role of some antibodies against candidiasis, we analysed the protection ability of those antibodies produced during colonization against a subsequent systemic infection. Our data showed that mice previously colonized with *C. albicans* had a better survival against a subsequent infection. Therefore, we can conclude that the humoral response generated during an intestinal colonization confers a partial protection against systemic infection.

## **Conclusions**

1. The obtained *Candida albicans* strain in which hyphal repressor *TUP1* expression depends on the TET regulatable system is an effective tool for studying the filamentous fungal growth, both *in vitro* and *in vivo*.
2. The use of autoclaved chlortetracycline (aCT) is an alternative to doxycycline in fungal pathogenesis studies, maintaining the efficiency and adding versatility to the tetracycline mediated regulation for *in vivo* studies. Oral administration of aCT in mice allows an effective modulation of cell morphology of this strain during the course of both colonization as systemic infection.
3. The induction of filamentous growth in *C. albicans* by repression of *TUP1* expression generates certain changes in the composition of the wall and the cell membrane of the fungus, reflected in a different sensitivity to certain antifungals and agents that interferes with the correct assembly of the cell wall.
4. Induction of filamentation by *TUP1* repression causes a decrease in both *in vitro* and *ex vivo* adhesion, increasing resistance to the fungicidal activity of macrophages and neutrophils and causing an increased production of IL-17A by neutrophils.
5. Induction of filamentation by *TUP1* repression causes the reduction or elimination of the fungal colonization rate, depending on whether it occurs at the beginning or after the establishment of gastrointestinal colonization in C57BL/6 mice. This filamentous growth causes a significant increase in IFN- $\gamma$  and IL-17A levels in the colon of colonized mice.
6. The analysis of serum obtained during gastrointestinal colonization in C57BL/6 mice reveals the presence of a strong humoral immune response, with elevation and maintenance of antibodies to Eno1, Met6, Hsp70, Pgk1 and Pdc11 proteins from the beginning of colonization and against protein Hxk2 at a late stage, maintaining low titers against the Hsp90 chaperone and showing a late appearance of antibodies to proteins Cdc19 and Asc1.
7. The differential pattern of antibodies detected by SERPA shows the immune system's ability to differentiate between intestinal colonization and systemic infection. Both models share only some antibodies to glycolytic, metabolic enzymes such as Eno1, Pgk1 and Pdc11 and two proteins of Hsp70 family.
8. The gastrointestinal colonization by *C. albicans* in C57BL/6 mice partially protects against a subsequent lethal infection in the model of systemic infection, suggesting that colonization develops a protective immune response.

# Introducción

---



## 1. *C. albicans* como modelo de hongo patógeno oportunista

Las infecciones producidas por hongos constituyen un problema sanitario de gran relevancia en la actualidad incluso en países desarrollados. Se trata de infecciones que cursan de forma superficial y benigna en la mayoría de los casos, pero que son especialmente graves en pacientes con deficiencias en el sistema inmunológico. Ello sucede con frecuencia en pacientes con cáncer o SIDA o en aquellos sometidos a tratamiento antibiótico o inmunosupresor, algo habitual con anterioridad o posterioridad a un trasplante de órganos. Los tratamientos modernos tendentes a prolongar la vida del paciente mediante el uso de técnicas de medicina más invasivas facilitan también la aparición de enfermedades de etiología fúngica en el ser humano.

Los hongos, principalmente las especies del género *Candida*, representan de hecho la cuarta causa de muerte por infecciones nosocomiales en Estados Unidos (periodo 1998 a 2003), alcanzando hasta un total de 60000 casos de candidiasis sistémica al año (Spellberg, Filler, *et al.*, 2006). Actualmente, los tratamientos frente a las infecciones por *Candida* son relativamente escasos, limitándose al uso de polienos, azoles y equinocandinas. La aparición de resistencias a algunos de estos antifúngicos (Akins, 2005) han reducido aún más las opciones de tratamiento. Aunque en los últimos años la incidencia de infecciones causadas por especies como *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* ha aumentado, la especie más frecuentemente aislada en muestras clínicas de pacientes de unidades de cuidados intensivos continua siendo *Candida albicans* (Vincent *et al.*, 2009). Ello es debido, principalmente, a su presencia como comensal de la cavidad oral y el tracto gastrointestinal y urogenital del ser humano (Soll, 2002), lo que facilita su diseminación en situaciones de inmunocompromiso. Todas estas características hacen que el estudio del hongo *C. albicans* se haya visto incrementado en las últimas décadas y es actualmente uno de los principales modelos de patogénesis fúngica.

### A. Generalidades

El hongo conocido hoy como *Candida albicans* fue descubierto por Langenbeck en 1839 en las aftas de un paciente con fiebre tifoidea (Knoke *et al.*, 2006). A pesar de que dicho autor sugirió (de forma errónea) que dicho microorganismo era el causante del tifus, su observación es relevante desde el punto de vista histórico, por ser una de las primeras descripciones en las que se asoció un microorganismo con un proceso patológico. La mayoría de las primeras descripciones de este microorganismo hacen referencia a su naturaleza dimórfica (Audry, 1887; Jillson *et al.*, 1948). De hecho, en 1877 Grawitz describió la forma de levadura y el micelio y, aunque no las llamó por su nombre, también describió las clamidosporas (Barnett, 2008).

En la actualidad, *C. albicans* es una especie del género *Candida* perteneciente al phylum *Ascomycota*, que fue clasificada durante muchos años en la clase *Deuteromycetes* o grupo de los hongos imperfectos por carecer de un ciclo sexual. Actualmente, se incluye



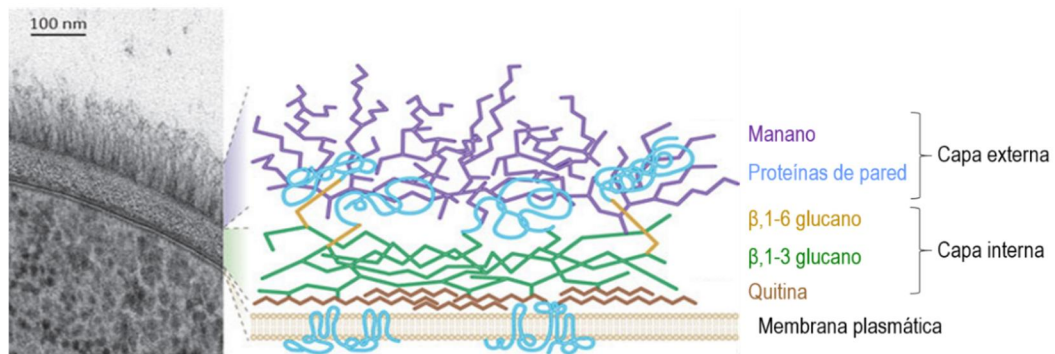
en el *phylum Ascomycota*, en el suborden *Saccharomycotina* y en la clase *Saccharomycetes* (Hibbett *et al.*, 2007). Se trata de un hongo patógeno unicelular diploide, dimórfico y que está presente en la superficie de la piel y mucosas de diversos organismos, entre ellos, el hombre. Su tamaño es del orden de 4  $\mu\text{m}$  cuando se presenta como blastospora y su material genético tiene un tamaño de 32 megapares de bases, organizado en 16 unidades funcionales (8 pares de cromosomas homólogos) (Doi *et al.*, 1992).

*C. albicans* forma parte de la microbiota comensal del ser humano, principalmente del tracto gastrointestinal y urogenital, sin causar enfermedad, siendo por tanto un microorganismo comensal. En estas condiciones, su proliferación se controla principalmente por la respuesta del hospedador, las barreras físicas y la propia microbiota del hospedador impiden la diseminación del hongo, manteniendo así el estado de comensalismo. Sin embargo, en condiciones que causan una alteración en las defensas del huésped, *C. albicans* es capaz de atravesar el epitelio de los tejidos o cavidades que coloniza y diseminarse a órganos internos, dando lugar a infecciones llamadas candidiasis que suelen tener una enorme gravedad. Se trata, por ello, de un patógeno oportunista (Dixon *et al.*, 1996; Garber, 2001). El interés en cómo tiene lugar este proceso de invasión ha centrado buena parte de los estudios en este organismo modelo en los últimos años.

## B. La pared celular de *C. albicans*

La pared celular de *C. albicans* es una estructura compleja y dinámica que actúa como barrera de permeabilidad y mantiene la forma del hongo. La composición de la pared cambia en función de las condiciones externas y las necesidades de la célula. Al ser la parte más externa de la célula, es la que es reconocida por las células de sistema inmunitario vía receptores específicos. Por ello, los cambios en su estructura son esenciales para establecer una eficaz interacción con el hospedador y pueden condicionar el curso de la propia infección fúngica (Gow & Hube, 2012).

La pared de *C. albicans* está constituida fundamentalmente por carbohidratos, que suponen entre el 80 y 90 % de la cantidad total (en peso seco) de la misma (Figura 1). La pared también cuenta con una pequeña cantidad de proteínas (6-25 %) y una menor cantidad de lípidos (1-7 %) (Chaffin *et al.*, 1998; Marcilla *et al.*, 1998). En general, los carbohidratos están implicados en el reconocimiento de las células por el sistema inmunitario, mientras que las proteínas se encargan de mediar la adhesión e interacción con la superficie de células del huésped. Diversas proteínas de la pared, tanto ancladas como secretadas, son también reconocidas por el sistema inmunitario dado su fuerte carácter antigénico. Algunas de estas proteínas, como ocurre con las proteasas aspárticas (Pietrella *et al.*, 2010) o la adhesina Als3 (Spellberg, Ibrahim, *et al.*, 2006) están adquiriendo relevancia para el desarrollo de vacunas frente a las candidiasis.



**Figura 1. Estructura de la pared celular de *C. albicans***

Esquema de la organización de la pared celular de *C. albicans*. Sobre la membrana plasmática se sitúan los diferentes componentes de la pared fúngica: quitina,  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucano, proteínas de la pared celular y mananos. Imagen tomada de Gow y Hube, 2012 (Gow & Hube, 2012).

Los carbohidratos de la pared se encuentran principalmente de tres formas:  $\beta$ -glucano (con enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6), manano (tanto en forma de fosfopeptidomanano o PPM) como de fosfolipomanano (PLM) y quitina (o su forma desacetilada, quitosán). Mientras que las manoproteínas se sitúan en la capa externa de la pared, el  $\beta$ -glucano (que supone el 50-60 % del peso seco de la pared) y la quitina (1-2 %) se encuentran en la región interna junto a la membrana plasmática. Estos polisacáridos estructurales son los principales encargados de conferir resistencia y dar forma a la pared.

Las proteínas de la pared celular (o CWP, *Cell Wall Proteins*) se encuentran mayoritariamente glicosiladas y se sitúan formando una capa de tipo fibrilar sobre las capas de  $\beta$ -glucano y quitina (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). Las manoproteínas forman una capa con una estructura menos definida, con baja permeabilidad y que determina en buena medida la porosidad de la pared celular. Están unidas a las proteínas mediante enlaces O-glicosídico (O-manano) y N-glicosídico (N-manano) y tienen un papel importante en la resistencia de la pared al ataque de determinadas moléculas del hospedador, así como en la permeabilidad de antifúngicos. Algunas de estas proteínas se unen al  $\beta$ -1,6 glucano a través de un anclaje de tipo GPI (glicosilfosfatidilinositol) aunque otras contienen repeticiones internas (denominadas de tipo Pir, *Protein with Internal Repeats*) y se unen directamente al  $\beta$ -1,3 glucano.

## C. Requisitos nutricionales y condiciones de crecimiento

Cualquier microorganismo, patógeno o comensal, requiere necesariamente adaptarse a las condiciones del hospedador, es decir sobrevivir y multiplicarse en el hospedador. Ello supone cambios fisiológicos importantes respecto de las condiciones fuera del mismo y que se manifiestan en muchos aspectos, entre ellos, la asimilación de los nutrientes

disponibles, la adaptación a posibles estreses y la evasión de las defensas del sistema inmunitario.

*C. albicans* puede asimilar tanto fuentes de carbono fermentables como no fermentables, en función de la disponibilidad y del microambiente en que se encuentre (Barelle *et al.*, 2006; Fradin *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2001). Así, por ejemplo, tras la interacción con células fagocíticas, se sintetizan enzimas implicadas en gluconeogénesis, en el ciclo del glioxilato y en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Fernandez-Arenas *et al.*, 2007; Fradin *et al.*, 2005; Lorenz *et al.*, 2004; Rubin-Bejerano *et al.*, 2003). Durante el crecimiento en mucosas predomina la activación de la glicolisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Wilson *et al.*, 2009; Zakikhany *et al.*, 2007), mientras que en el torrente sanguíneo y la diseminación a riñones, el hongo puede presentar tanto actividad glicolítica como gluconeogénica en función del entorno en que se encuentre (Barelle *et al.*, 2006).

*C. albicans* compite por la asimilación de nutrientes con los microorganismos que constituyen la microbiota intestinal (Brock, 2009), al ser éste uno de los nichos que habitualmente ocupa. En los órganos diana, tras una translocación intestinal, el hongo se enfrenta a condiciones nutricionales muy diversas (que en ocasiones presentan baja disponibilidad de glucosa) y ello conlleva el uso de rutas metabólicas alternativas (Fleck *et al.*, 2011). El oxígeno es uno de los factores que influyen de forma importante en el crecimiento de *C. albicans*. En general, los hongos patógenos pueden crecer tanto en presencia de  $O_2$  como en condiciones limitantes de este compuesto dentro del hospedador. En el interior del cuerpo humano, los niveles de  $CO_2$  son alrededor de 100 veces mayor que en la atmósfera, oscilando entre el 4,5 y el 30 %. La disponibilidad tanto de  $O_2$  como de  $CO_2$  no solo requiere de una adaptación metabólica sino que también condiciona la morfología del hongo. Se ha descrito que los altos niveles de  $CO_2$  inducen la filamentación (Hall *et al.*, 2010) así como la transición white-opaque (Huang *et al.*, 2009), mientras que las condiciones de microaerofilia o hipoxia conllevan la formación de clamidosporas *in vitro* (Sonneborn *et al.*, 1999) e inducen la filamentación en medio sólido (Brown, Giusani, *et al.*, 1999).

La asimilación de metales como hierro, zinc, cobre o manganeso también es esencial para la síntesis y el correcto funcionamiento de un gran número de proteínas de *C. albicans*, por lo que su carencia puede limitar la capacidad de colonización del microorganismo. Tanto los microorganismos patógenos como el hospedador han desarrollado estrategias para adquirir y restringir, respectivamente, el acceso a dichos metales (Caza *et al.*, 2013). La asimilación de hierro es de gran relevancia en *C. albicans*, debido a la diversidad de estrategias de captación de las que dispone: directamente de la hemoglobina en la sangre, a través de sideróforos secretados por otros microorganismos y a partir de proteínas del hospedador ricas en este metal, como la transferrina o la ferritina (Almeida *et al.*, 2009).

La importancia de estos procesos nutricionales se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones. La delección de genes implicados en la síntesis de bases (Cole *et al.*, 1995), el ciclo del glioxilato (Lorenz *et al.*, 2001), la síntesis o asimilación de fuentes de carbono o

ácidos grasos (Zaragoza *et al.*, 1998) o la captación de metales (Murciano *et al.*, 2012) generan cepas con una menor virulencia en modelos de candidiasis *in vivo*, así como menor capacidad de dañar el epitelio.

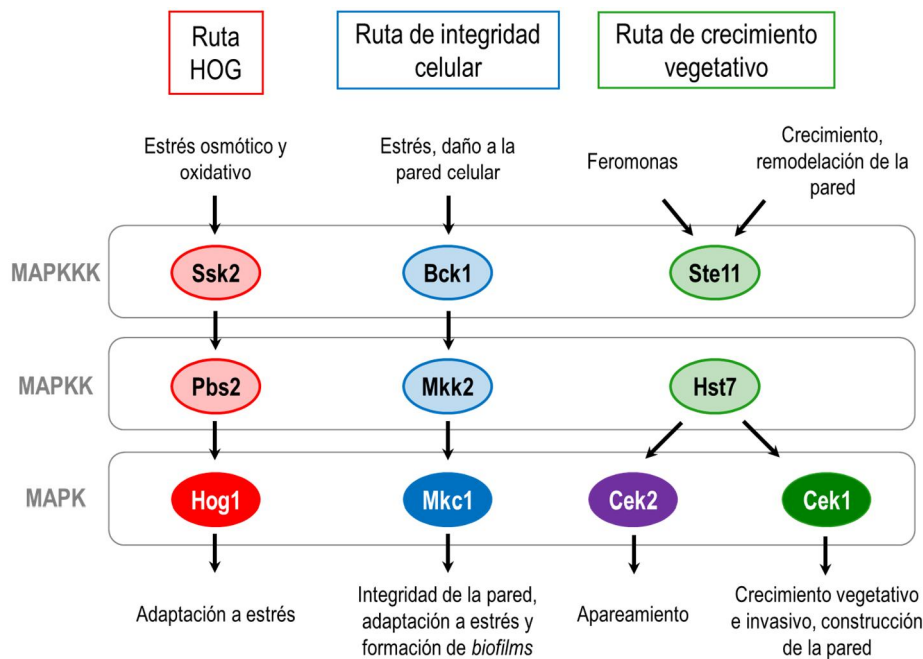
## D. Rutas que regulan la adaptación al medio

*C. albicans*, al igual que el resto de organismos, dispone de mecanismos de señalización implicados en la adaptación a los continuos cambios en el entorno que le rodea. Esta adaptación está mediada por rutas de transducción de señales, capaces de convertir un determinado estímulo externo en una señal intracelular que es transmitida para generar una respuesta específica frente al estímulo recibido. Esta señalización modifica la expresión génica. Algunas rutas de transducción de señales en este hongo están implicadas en su morfogénesis y se detallan a continuación.

### a) Rutas mediadas por MAPKs

Uno de los tipos de cascadas de señalización más importantes es el de las rutas mediadas por quinasas del tipo MAP (o MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*) (Cowan *et al.*, 2003), altamente conservadas desde eucariotas unicelulares hasta vertebrados.

Las rutas de MAP quinasas presentan un módulo central formado por tres quinasas de tipo MAP (MAPK, MAPKK y MAPKKK) a través de las cuales, y mediante fosforilaciones secuenciales, se transmite la señal recibida. El estímulo que las activa es detectado en la membrana de la célula por receptores específicos y transferido mediante moléculas adaptadoras de tipo PAK o GTPasas al módulo central de la ruta de transducción formado por las tres quinasas. La MAPK es la última en fosforilarse y puede translocarse al núcleo, dónde fosforila a su vez factores de transcripción (que puede formar parte de un complejo, TFC o *Transcription Factor Complex*) o a una molécula represora. Ello conlleva la activación/represión de un gen o grupo de genes determinado desencadenándose así la correspondiente respuesta adaptativa. En *C. albicans* se han descrito tres rutas principales de MAPKs, implicadas entre otros muchos mecanismos, en la morfogénesis del hongo (Figura 2).



**Figura 2. Rutas de señalización mediadas por MAPKs**

Esquema general de la rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs descritas en *C. albicans*.

### - Ruta de integridad celular

El mantenimiento de la integridad celular depende fundamentalmente de la ruta en la que participa la MAPK Mkc1, la primera quinasa de este tipo en identificarse en este microorganismo (Navarro-Garcia *et al.*, 1995). Mkc1 se activa en condiciones de estrés oxidativo ( $H_2O_2$ , menadiona), nitrosativo y osmótico (sorbitol), frente a daños en la pared celular, en la formación de biopelículas y en presencia de antifúngicos, entre otras condiciones (Navarro-Garcia *et al.*, 2005). La delección de *MKC1* provoca alteraciones morfogénicas, siendo el mutante *mkc1* incapaz de formar hifas en medio Spider (inductor de la filamentación) o invadir dicho medio. A pesar de ello, la ausencia de Mkc1 no afecta a la formación de hifas en otros medio inductores, como el medio Lee o en presencia de suero (Navarro-Garcia *et al.*, 1998).

### - Ruta HOG

La ruta HOG (High Osmolarity Glycerol) participa en la adaptación a estrés oxidativo y osmótico, en filamentación y en virulencia en un modelo murino de infección sistémica (Alonso-Monge *et al.*, 1999). En esta cascada de señalización, la MAPK Hog1 es fosforilada por su correspondiente MAPKK Pbs2 en respuesta al estímulo recibido, generalmente estrés osmótico y oxidativo (Arana *et al.*, 2005). Esta ruta también está implicada en morfogénesis, ya que los mutantes *hog1* y *pbs2* son hiperfilamentosos en condiciones no inductoras o levemente inductoras de esta transición (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Arana *et al.*, 2005). La ruta HOG no sólo participa en la formación de hifas sino

también en la aparición de clamidosporas, ya que la delección de este gen conlleva la incapacidad de formar estas estructuras (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Eisman *et al.*, 2006).

### - Ruta de crecimiento vegetativo

La ruta SVG (del inglés, Sterile Vegetative Growth) está mediada por la MAPK Cek1 y está implicada en la morfogénesis, la filamentación y en el apareamiento de *C. albicans*. La activación de esta ruta se produce por estímulos externos tales como la presencia de compuestos que dañan la pared celular (rojo de Congo, zimoliasa) o la dilución en medio fresco de levaduras procedentes de fase estacionaria del crecimiento, entre otros (Roman *et al.*, 2005). El farnesol, una molécula de *quorum sensing* y regulador de la transición dimórfica (Hornby *et al.*, 2001), se ha descrito que bloquea la fosforilación de Cek1 en estas condiciones (Roman *et al.*, 2009).

La eliminación de *CEK1* da lugar a defectos en el crecimiento filamentosos e invasivo del hongo en condiciones limitantes de determinadas fuentes de carbono o de nitrógeno, proceso mediado por la activación del factor de transcripción Cph1 (Kohler *et al.*, 1996). Se ha descrito la virulencia atenuada del mutante *cek1* en una infección sistémica en ratón (Csank *et al.*, 1998). El mutante *cph1* presenta defectos en la formación de hifas en algunos medios líquidos; sin embargo, es capaz de filamentar en presencia de suero, lo que evidencia la implicación de muchas otras rutas (además de ésta) en la transición levadura-hifa (Liu, 2001).

### b) Ruta cAMP-PKA

La ruta de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMP cíclico (cAMP) regula el crecimiento y la diferenciación celular en células eucariotas. La proteína PKA es una holoenzima tetramérica (contiene dos subunidades catalizadoras y dos reguladoras) que se encuentra normalmente inactiva. El cAMP se une a las subunidades reguladoras, disociándolas de las catalizadoras (Tpk1 y Tpk2), permitiendo a estas últimas la fosforilación de sustratos y la correspondiente respuesta.

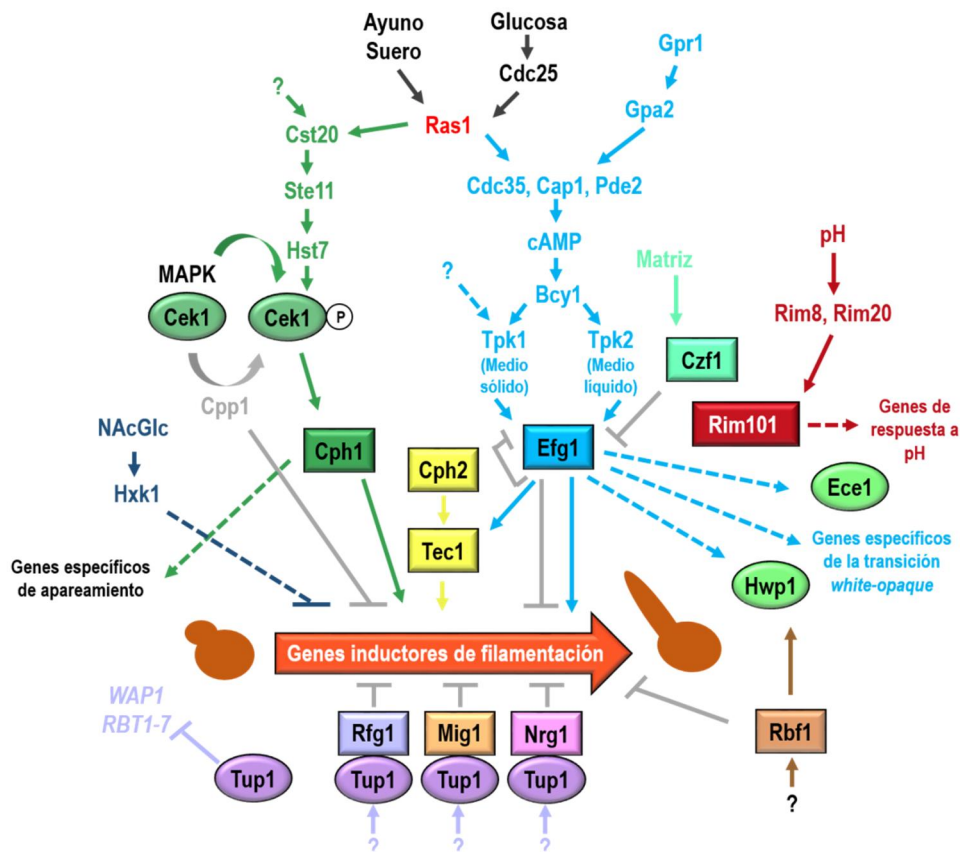
En *C. albicans*, durante la transición levadura-hifa, se produce un incremento en los niveles de cAMP y PKA fosforila el factor de transcripción Efg1, uno de los reguladores morfogénicos más importantes en este organismo. La actividad de Efg1 se regula, además de por las subunidades Tpk1 y Tpk2, por otros elementos importantes de la ruta como Cdc35, Pde2, Cap1 y Bcy1 (Bockmuhl *et al.*, 2001; Brown & Gow, 1999; Doedt *et al.*, 2004; Leberer *et al.*, 2001). La señalización a través de cAMP funciona en paralelo con la mediada por Cek1 en la regulación del crecimiento filamentosos. Un mutante doble *efg1 cph1* es incapaz de filamentar *in vitro* en diversas condiciones experimentales, y es uno de los organismos más frecuentemente empleados en los estudios sobre la formación de hifas (Lo *et al.*, 1997).

Otro de los elementos fundamentales de la ruta PKA es Ras1, cuya delección también conlleva defectos en filamentación (Feng *et al.*, 1999). Estos defectos pueden ser



compensados mediante la adición de cAMP exógeno o incluso sobre expresando algunos elementos de la ruta mediada por Cek1. Ni la delección de *RAS1* ni la de *CDC25* inducen un aumento de cAMP inducido por suero y glucosa respectivamente, por lo que se ha propuesto que sean estas dos proteínas las que determinen la respuesta a glucosa (Maidan *et al.*, 2005).

En la Figura 3 se detallan las principales rutas de señalización implicadas en la transición dimórfica.



**Figura 3. Rutas implicadas en la regulación de la filamentación en *C. albicans***

Esquema basado en Biswas, 2007 (Biswas *et al.*, 2007) en el que se representa la compleja regulación de la formación de hifas en *C. albicans*. Destacan la ruta AMPc-PKA (cuyo factor de transcripción Efg1 es fundamental para la inducción de la filamentación) y la ruta mediada por Cek1 (que actúa a través de Cph1). Tup1 es el principal regulador negativo de la filamentación, atraído por Rfg1, Mig1 y Nrg1. Todos los factores de transcripción aparecen representados en rectángulos.

## E. Mecanismos de regulación de la morfología en *C. albicans*

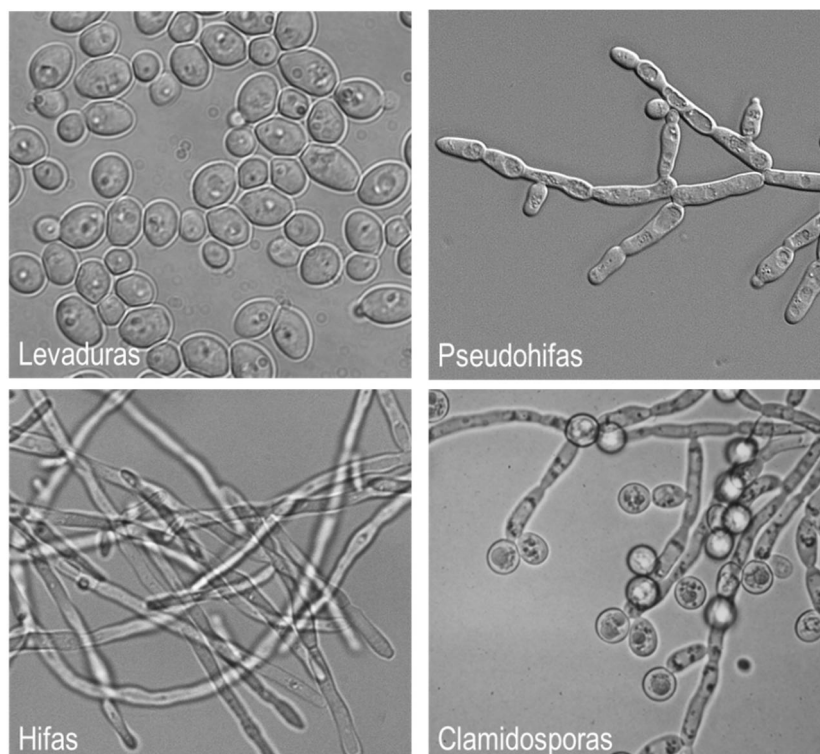
Gran variedad de hongos, algunos de ellos patógenos, poseen la capacidad de alterar su forma presentando más de una morfología; este proceso está regulado genéticamente y se han implicado diversos factores de transcripción en el mismo (Ernst, 2000). El término “dimorfismo” es bastante común para referirse a muchos hongos. *C. albicans* presenta varias morfologías durante su crecimiento, siendo capaz de formar levaduras, hifas, pseudohifas o clamidosporas en respuesta a determinadas condiciones nutricionales y ambientales (Sudbery *et al.*, 2004). Debido a esto, *C. albicans* se considera un microorganismo polimórfico. La morfología predominante es la levadura o blastospora, de forma redonda u ovalada, que crece dando lugar a células individuales por gemación (Figura 4). Durante la gemación, se genera nuevo material celular a partir de un punto concreto de la blastospora. Cuando la gema aumenta de tamaño, queda separada de la célula madre mediante un septo de quitina hasta que se separa definitivamente. Bajo determinados estímulos se induce la formación de tubos germinativos y el crecimiento en forma de micelio. Las pseudohifas y las hifas completas son consideradas las formas filamentosas de este hongo.

La habilidad de llevar a cabo esta transición es uno de los aspectos más característicos de *C. albicans*, y a cada morfología se le han atribuido diferentes papeles en la patogenicidad del microorganismo. Tanto las levaduras como las hifas presentan un crecimiento polarizado, aunque en el caso de los filamentos, es más evidente. Este proceso está controlado por las GTPasas de la familia Rho, concretamente por las proteínas Cdc42 y Rac1 (Fukata *et al.*, 2003; Jaffe *et al.*, 2005). Durante la filamentación, el factor Cdc42 implicado en la regulación del ciclo celular permanece en el extremo del tubo germinativo, teniendo por tanto un papel importante en dicha transición. La disminución de la actividad GTPasa por delección del factor Cdc42 bloquea la formación del tubo germinativo (Bassilana *et al.*, 2005), mientras que la sobreexpresión de dicho factor incrementa el crecimiento filamentosos (Court *et al.*, 2007).

Las pseudohifas fueron consideradas en un principio como una morfología intermedia entre levadura e hifa; sin embargo estudios posteriores demuestran que sigue un patrón específico de crecimiento (Sudbery *et al.*, 2004). Esta morfología se origina con la gemación de la blastospora seguida de la formación del tubo germinativo. Las células hijas no se separan de la madre sino que permanecen unidas y las siguientes unidades celulares son diferenciadas por constricciones de la pared celular. En cambio, las hifas son formas alargadas constituidas por múltiples unidades celulares separadas por septos de quitina. Éstos se originan al formarse el tubo germinativo por extensión apical de la blastospora. Determinadas condiciones nutricionales inducen el crecimiento pseudohifal, como la alta concentración de fosfato en el medio de cultivo (Hornby *et al.*, 2004) o la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Srinivasa *et al.*, 2012). Se han descrito numerosos genes cuya delección da lugar a un crecimiento pseudohifal, muchos de ellos implicados en la regulación del ciclo celular, lo que relaciona ambos procesos: la modulación del tiempo que emplea la célula para llevar a cabo el crecimiento polarizado repercute en la formación de pseudohifas (Whiteway *et al.*, 2007).



Las clamidosporas son células grandes y refringentes localizadas en los extremos de hifas y pseudohifas y unidas a ellas mediante células suspensoras. Presentan una pared celular muy gruesa (Jansons *et al.*, 1970) y con un alto contenido tanto de carbohidratos como de lípidos. De hecho, su nombre viene del griego “*chlamys*” que significa “envuelta protectora”. Aunque se ha llegado a identificar en el tracto gastrointestinal (Cole *et al.*, 1991), normalmente las clamidosporas se forman *in vitro* bajo determinadas condiciones como son medios pobres en glucosa o nutrientes en general, baja temperatura (24 – 28°C) o baja disponibilidad de oxígeno (Dujardin *et al.*, 1980; Montazeri *et al.*, 1984). En ocasiones, la inducción de la formación de clamidosporas se emplea para diferenciar a *C. albicans* de otras especies del mismo género, al ser una morfología característica de esta especie (Staib *et al.*, 2007).



**Figura 4. Morfologías celulares de *C. albicans***

La forma levaduriforme o blastospora es la forma unicelular del hongo, con forma elipsoidal y un tamaño de entre 4 y 6 micras. Las hifas, alargadas, están compuestas por unidades celulares separadas por septos de quitina, que se forman por extensión apical de la blastospora dando lugar a un tubo germinativo que se va elongando con el tiempo. Las pseudohifas, formadas por gemación de la blastospora, están constituidas por unidades celulares entre las que no existen verdaderos septos sino constricciones de la pared celular. Las clamidosporas son células grandes, refringentes y de pared gruesa que se localizan en los extremos de las hifas y pseudohifas a las que se unen mediante células suspensoras. Su formación, principalmente *in vitro*, requiere determinadas condiciones como ausencia de luz, baja temperatura o microaerofilia. Imágenes cortesía de Dr. Darren Thomson (pseudohifas) y Dr. Michael McGinnis (clamidosporas). Las imágenes de levaduras e hifas pertenecen a este trabajo.

Aunque la transición de levadura a hifa es el mecanismo más estudiado en relación al polimorfismo del hongo, los cambios de morfología colonial o *switching* también son de gran relevancia. *C. albicans* es capaz de llevar a cabo cambios fenotípicos como la transición 3135A (Morrow *et al.*, 1994), basada en la alternancia entre siete tipos de morfología colonial distintos, que varían entre blastospora, pseudohifa e hifa.

Sin embargo, la mayoría de otros estudios se han enfocado en la transición de tipo *white-opaque*, en la cual las células pasan de la forma de levadura habitual que genera colonias de aspecto cremoso (*white*) a convertirse en células más grandes y elongadas con protuberancias en la pared celular (denominadas *opaque*) (Anderson *et al.*, 1987; Slutsky *et al.*, 1987). La función principal de la transición *white-opaque* es la regulación del apareamiento entre células diploides. El cambio a la forma opaca se produce cuando la célula es homocigota para el locus MTL; sin embargo la mayor parte de células son heterocigotas (MTLa/MTLa) (Miller *et al.*, 2002). El principal regulador de la transición *white-opaque* es el factor de transcripción *WOR1* (también descrito como *TOS1*) (Huang *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2006), cuya delección bloquea por completo dicha transición. Por el contrario, unos niveles altos de *Wor1* inducen el desarrollo de la forma opaca, incluso si la célula es heterocigota para el locus MTL (Zordan *et al.*, 2006). La regulación de la expresión de *WOR1* es controlada principalmente por los factores de transcripción *EFG1*, *CZF1* y *WOR2* (Zordan *et al.*, 2007). Se ha descrito que los niveles de *Efg1* son controlados por *Czf1* y *Ahr1* durante la forma blanca de la célula, mientras que *Efg1*, *Czf1*, *Ahr1*, *Wor2* y *Wor3* regulan los niveles de *Wor1* en la forma opaca (Hernday *et al.*, 2013).

El estudio de la regulación del dimorfismo de *C. albicans*, además de por su implicación en virulencia, es en sí mismo importante como modelo de diferenciación celular. La transición morfológica es un proceso multifactorial en el que numerosas señales externas determinan cada una de las formas que presenta el hongo. El pH y la temperatura son algunos de los principales factores ambientales que regulan este proceso. Las temperaturas cercanas a 37°C favorecen la formación de hifas, mientras que a temperaturas alrededor de 30°C la morfología tiende a ser levaduriforme (Lee *et al.*, 1975). El pH del medio promueve la formación de levaduras en valores en torno a la neutralidad mientras que valores superiores induce el crecimiento filamentoso (Soll, 1986). Determinados factores nutricionales como suero (Gow *et al.*, 1982), prolina (Dabrowa *et al.*, 1981) o N-acetilglucosamina (Simonetti *et al.*, 1974) también han sido descritos como claros inductores de la transición levadura-hifa.

Uno de los fenómenos importantes en la regulación de la morfogénesis es la percepción de quórum (o *quorum sensing*), basada en la regulación de la expresión génica en respuesta a una determinada densidad de población celular (Hornby *et al.*, 2001). La comunicación entre células fúngicas se produce al alcanzarse una alta concentración celular, lo que provoca la secreción de gran variedad de moléculas, detectadas a su vez por la misma población (Hogan, 2006). Estas moléculas autoinductoras conllevan numerosos procesos, entre ellos los cambios en la morfología.

En *C. albicans* se ha descrito que la baja densidad celular favorece la formación del tubo germinativo, mientras que altas concentraciones de células reprimen este mecanismo (Hornby *et al.*, 2001). Además, se han identificado algunas moléculas implicadas en el fenómeno de *quorum sensing* en este hongo y que presentan funciones antagónicas en morfogénesis. El farnesol reprime la transición de levadura a hifa a través de la inhibición de la adenilato ciclasa (Cyr1), que junto al cAMP y Efg1, compone una de las principales rutas inductoras de la filamentación (Lindsay *et al.*, 2012; Piispanen *et al.*, 2013). Por el contrario, el tirosol acorta la fase de latencia en el crecimiento del hongo, lo cual estimula la formación del tubo germinativo (Chen *et al.*, 2004).

Otro de los procesos relacionados con el dimorfismo de *C. albicans* en la formación de biopelículas o *biofilms*. Se ha descrito que la filamentación es un paso muy relevante en la formación de biopelículas altamente estructuradas (Baillie *et al.*, 1999) aunque es distinguible de la capacidad de formar biopelículas (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2005). De hecho, la delección de *EFG1*, implicado en la transición, conlleva la incapacidad de la célula para formar biopelículas (Ramage, VandeWalle, *et al.*, 2002). Así mismo, este proceso está estrechamente implicado con el de *quorum sensing*, dado que el farnesol, además de bloquear la filamentación, también impide la formación de estas estructuras (Ramage, Saville, *et al.*, 2002).

Gran parte de los estudios acerca del dimorfismo de *C. albicans* se centran en los numerosos factores de transcripción que se encargan de regular este proceso (Ernst, 2000). Así, se ha descrito en gran cantidad de genes la capacidad de regular la filamentación, tanto de forma positiva como negativa. Uno de los objetivos más importantes es determinar las conexiones entre la actividad de estos factores de transcripción y la señalización mediada por otras rutas implicadas en este mecanismo.

Efg1 es uno de los principales inductores de esta transición. Efg1 presenta en su estructura un motivo bHLH (región básica hélice-giro-hélice) y pertenece a la familia APSES, dado que es un regulador morfogénico muy importante (Doedt *et al.*, 2004; Stoldt *et al.*, 1997). Como se ha indicado, la actividad de Efg1 está ligada a la ruta PKA dependiente de cAMP, y la relación entre ambas ha sido ampliamente descrita (Saputo *et al.*, 2014). Aunque la sobreexpresión de *TPK2*, una de las subunidades catalizadoras de la PKA, no es capaz de complementar la ausencia de *EFG1*, la sobreexpresión de éste sí puede compensar los defectos en filamentación de un mutante *tpk2* (Sonneborn *et al.*, 2000). Una función esencial de Efg1 es la regulación de la filamentación en condiciones inductoras de dicho proceso, como es la presencia de suero. La sobreexpresión de *EFG1* induce el crecimiento pseudohifal y por el contrario su delección conlleva defectos en este tipo de crecimiento en numerosas condiciones (Lo *et al.*, 1997). El mutante *efg1* no es capaz de filantar en presencia de compuestos inductores como el suero o la N-acetilglucosamina, tanto en medio líquido como sólido. Sin embargo, sí puede formar hifas en condiciones de microaerofilia, lo que indica que Efg1 actúa como activador o represor de otros genes en función de las condiciones ambientales (Giusani *et al.*, 2002). El doble mutante *efg1 cph1* no sólo es incapaz de formar hifas sino que también es avirulento durante una infección sistémica en ratón (Lo *et al.*, 1997). Sus correspondientes

mutantes simples sin embargo, no se comportan de la misma manera. La delección de *EFG1* conlleva una leve atenuación de su virulencia mientras que la ausencia de *CPH1* no parece alterar la capacidad de infectar (Lo *et al.*, 1997). Esto sitúa a ambos elementos en rutas distintas pero con una función común en la regulación del dimorfismo y la virulencia.

Entre los muchos factores con los que interacciona Efg1 destaca Flo8, un elemento esencial para la filamentación. Al ser activado, Flo8 controla gran parte de los genes diana sobre los que actúa Efg1 (Cao *et al.*, 2006). Otro factor importante es Int1, cuya delección conlleva defectos en la formación de hifas en la mayor parte de medios inductores, a excepción de la adición de suero (Gale *et al.*, 1998).

En la regulación positiva de la transición dimórfica intervienen también numerosos elementos. Cdc5, una proteína de tipo Plk (*polo-like kinase*), es un importante elemento regulador del ciclo celular cuya ausencia da lugar a la detención del ciclo en fases tempranas de la división del núcleo. Este proceso conlleva la formación de hifas, incluso en medios no inductores para ello (Bachewich *et al.*, 2003). Por su parte las quinasas dependientes de ciclina (Cdks) regulan las principales transiciones en *C. albicans*, y en el caso de la formación de hifas podemos destacar la actividad de Ccn1, Hgc1 y Cln3. Las células carentes de *CCN1* son incapaces de mantener el crecimiento filamentoso en determinadas condiciones del crecimiento, mientras que la ausencia de *HGC1* bloquea toda posibilidad de formación de hifas (Zheng *et al.*, 2004).

Otras proteínas de tipo quinasa presentan una implicación específica en el crecimiento hifal, como Gin4 y Hsl1, fundamentales en la formación de los septos de quitina que separan las unidades celulares en las hifas. Por tanto, la delección de ambos da lugar a un crecimiento pseudohifal constitutivo (Wightman *et al.*, 2004).

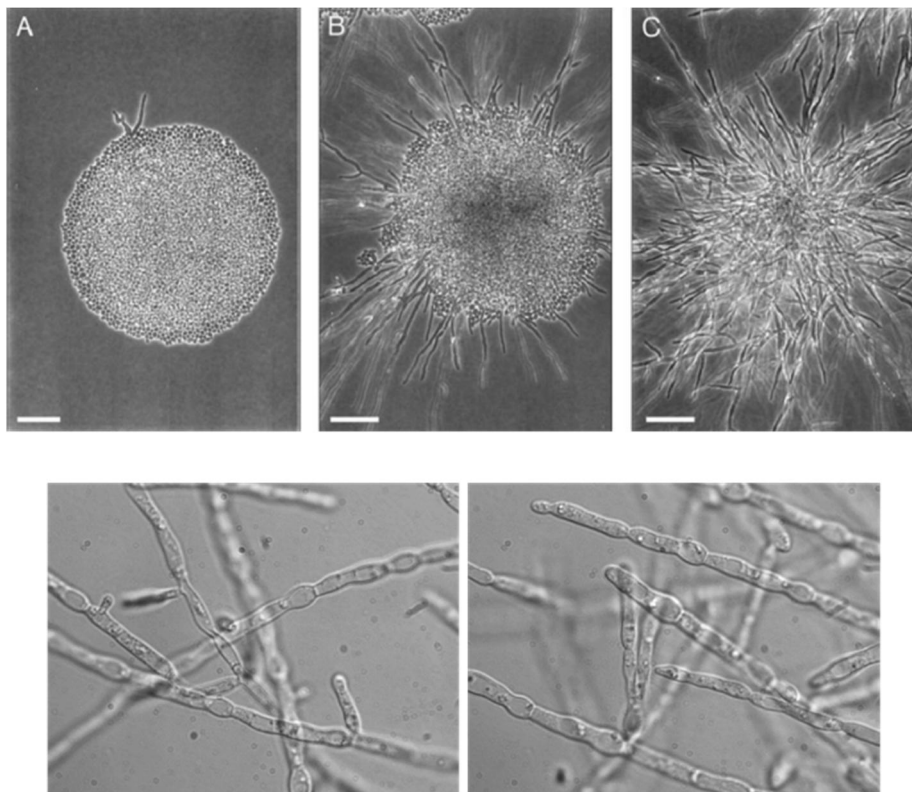
La activación transcripcional es un proceso ampliamente descrito, que implica interacciones específicas de proteínas de unión al ADN, reclutamiento de la ARN polimerasa e iniciación de la transcripción, principalmente. La represión transcripcional, sin embargo, es más difícil de definir. La llamada “represión activa” consiste en la inhibición de la expresión de uno o varios genes aun cuando los elementos activadores están presentes, y puede ocurrir a través de distintos mecanismos: modulación en la acetilación de histonas, formación de estructuras especializadas de la cromatina y mediante la interacción directa con la maquinaria transcripcional (Smith *et al.*, 2000).

De la misma manera que se han descrito numerosos genes como inductores del crecimiento filamentoso, también se han identificado muchos otros que funcionan como reguladores negativos de este proceso. Entre ellos cabe destacar *TUP1*, cuya implicación en la señalización dirigida a regular la transición dimórfica detallaremos a continuación.

El represor Tup1 es uno de los principales responsables del mantenimiento de la morfología levaduriforme en condiciones no inductoras de la filamentación. En *Saccharomyces cerevisiae*, Tup1 controla la expresión de aproximadamente 60 genes, implicados en procesos como el metabolismo de glucosa y la respuesta a estrés oxidativo y a daños en el ADN, entre otros (DeRisi *et al.*, 1997). Su homólogo en *C. albicans*

contiene siete repeticiones de tipo WD40, esenciales en establecer la interacción entre proteínas y que, en el caso de Tup1 median la unión a proteínas de unión al ADN o DBPs (*DNA-binding proteins*) de forma similar a *S. cerevisiae* (Keleher *et al.*, 1992; Komachi *et al.*, 1997).

En *C. albicans*, *TUP1* fue caracterizado por primera vez por Braun en 1997. Este autor obtuvo el mutante *tup1* mediante dos rondas de delección (Fonzi *et al.*, 1993) en la que se eliminó la secuencia completa del gen además de las 330 pares de bases anteriores al marco abierto de lectura. El fenotipo del mutante resultó ser filamentoso en todas las condiciones analizadas, las cuales incluían medio rico YPD, medio mínimo, presencia de fuentes de carbono fermentables y no fermentables y varios medios suplementados con inductores de la filamentación (Braun, 1997). El mutante heterocigoto *TUP1/tup1*, con sólo una copia del gen, mostró un fenotipo intermedio, presentando tanto levaduras como hifas. Este efecto dependiente de dosis génica indicaba no sólo su función represora sobre la filamentación, sino también que la proteína se producía, presumiblemente, en cantidades limitantes.

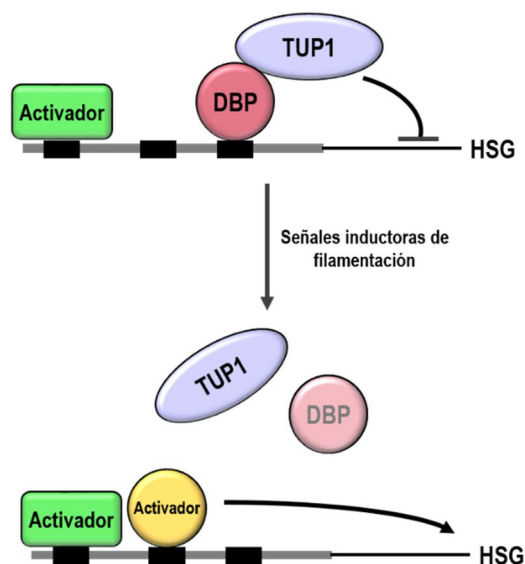


**Figura 5. Fenotipo de la cepa mutante *tup1Δ***

En el panel de arriba se muestra el aspecto de colonias de las cepas SC5314 (A), el mutante heterocigoto *TUP1/tup1* (B) y el homocigoto *tup1Δ* (C) tras 25 horas de crecimiento en medio de harina de maíz con Tween 80 y a 25 °C (imagen de Braun y Johnson, 1997). En la parte inferior, se observa el fenotipo filamentoso del mutante *tup1Δ* tras un crecimiento en medio líquido YPD durante 16 horas y a 37 °C.



Además, a nivel molecular, su función parece ser similar a la de *S. cerevisiae*, no sólo porque las secuencias de ambos están muy conservadas, sino porque la proteína procedente de *C. albicans* complementaba el fenotipo de un mutante *tup1* de *S. cerevisiae* (Braun, 1997). Se ha propuesto un modelo acerca del funcionamiento de Tup1, en el que éste funciona mediante la interacción con otros represores que se unen al ADN. En condiciones estándar de crecimiento, estos factores de transcripción atraen a Tup1 y ambas proteínas forman un complejo encargado de bloquear la expresión de genes que inducen la filamentación. Así, el hongo presenta forma de levadura en condiciones estándar, mientras que las condiciones inductoras de la transición impiden la unión del complejo formado por Tup1 a estos genes, permitiendo su expresión y generando la formación de hifas (Figura 6). Se ha descrito que los mutantes *tup1* parecen presentar mayor rapidez en su crecimiento respecto de una cepa silvestre, a la vez que acumulan una mayor cantidad de glicerol (Braun, 1997).



**Figura 6. Control de la filamentación por Tup1**

Modelo de control de la filamentación mediante Tup1. La represión de Tup1 es regulada por señales externas a través de una proteína de unión al DNA (DBP), condicionando la expresión de genes específicos del crecimiento filamentoso (HSG).

Se ha descrito que Tup1 forma un complejo represor junto a la proteína Ssn6 (García-Sánchez *et al.*, 2005; Jabet *et al.*, 2000). Este complejo es atraído por determinados factores de transcripción, que lo guían hasta las secuencias específicas inductoras de la filamentación, a las que el complejo bloquea. El complejo puede actuar interfiriendo directamente con el activador o la maquinaria transcripcional o bien alterando la estructura de la cromatina.

El desarrollo de arrays de DNA ha permitido la identificación de genes regulados por *TUP1* (Braun, Head, *et al.*, 2000). Dentro de los genes diana o regulados por Tup1 se encuentra *HWP1* (*Hyphal wall protein*), que codifica una proteína fundamental en la formación de la pared celular durante el crecimiento filamentoso, por lo que su delección conlleva defectos en la transición en determinadas condiciones. La regulación en la expresión de Hwp1 no sólo es controlada por Tup1, sino también por Efg1 y Rbf1 (Sharkey *et al.*, 1999). *WAP1* (también llamado *CSA1*) codifica una proteína que actúa como antígeno en la superficie de *C. albicans*, especialmente en hifas (Lamarre *et al.*, 2000). Sus niveles de transcripción

son regulados por Efg1 y Cph1 (Sohn *et al.*, 2003) y su expresión es reprimida por Tup1 (Braun, Head, *et al.*, 2000).

El papel de Tup1 en la regulación de la filamentación implica a dos factores de transcripción fundamentales, como son Nrg1 y Rfg1. Nrg1 reprime la transición dimórfica a través de Tup1 en condiciones estándar de crecimiento, mientras que en condiciones inductoras, como son la presencia de suero, sus niveles disminuyen, lo que conduce a una mayor expresión de determinados genes específicos de hifas y por tanto a la formación de éstas (Braun *et al.*, 2001). La delección de *NRG1* conlleva un fenotipo filamentosos, aunque en menor medida que la delección de *TUP1*. Ambos elementos controlan la expresión de genes como *ALS1*, *ALS3*, *HWP1* y *ECE1*. A su vez, Nrg1 y Tup1 están implicados en la señalización inducida por Tor1, por lo que una disminución en los niveles de dicha proteína puede alterar los niveles de ambos represores y por lo tanto también la expresión de sus correspondientes genes diana (Bastidas *et al.*, 2009). El factor de transcripción Rfg1 presenta un papel similar, uniéndose a Tup1 para controlar la expresión de genes específicos de filamentación (Kadosh *et al.*, 2001). La unión de Tup1 a Nrg1 y Rfg1 es clave en la regulación de la transición dimórfica, a través del control que ejercen sobre aquellos genes cuya expresión induce este proceso (Kadosh *et al.*, 2005). El complejo represor que forma Tup1 también interacciona con Sko1, elemento importante en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo y en la represión de la filamentación. La fosforilación de Hog1 en condiciones de estrés oxidativo conlleva la interacción entre Sko1 y Tup1 (Alonso-Monge *et al.*, 2010; Proft *et al.*, 2001).

También es relevante la familia de proteínas RBT (*Repressed by TUP1*) que, al igual que Hwp1 y Wap1, se localizan en la superficie celular. *RBT1* y *RBT5* codifican proteínas de tipo GPI (ancladas a la superficie por glicosil-fosfatidil-inositol), mientras que *RBT2* y *RBT7* codifican una reductasa férrica y una proteína secretada similar a la RNasa T2 (Braun, Head, *et al.*, 2000). En concreto, Rbt1 participa en la adhesión del hongo tanto a células epiteliales como a superficies abióticas. Además, su exposición en la superficie celular cambia en función de la morfología (Monniot *et al.*, 2013).

La regulación de la producción de diversas proteínas de superficie celular por Tup1 refleja, evidentemente, las modificaciones que sufre la pared celular de *C. albicans* durante la transición levadura-hifa (Alloush *et al.*, 1996; Braun & Johnson, 2000; Castillo *et al.*, 2006; Chaffin *et al.*, 1998; Staab *et al.*, 1996).

La composición de la pared celular de *C. albicans* es altamente variable en la transición de levadura a hifa (Chaffin, 2008). Estos cambios en los componentes alteran la accesibilidad de los PAMPs y ello modifica el tipo de respuesta inmune. La filamentación altera la exposición de mananos,  $\beta$ -glucanos y quitina, lo cual influye en la interacción con los receptores PRRs de células del sistema inmune innato como macrófagos y neutrófilos (Jouault *et al.*, 2009; Netea, Brown, *et al.*, 2008). Se ha descrito que cambios en la exposición de  $\beta$ -glucano tienen lugar durante la filamentación que influyen en la sensibilidad a caspofungina (Wheeler *et al.*, 2008), y a la síntesis de citoquinas (Wheeler *et al.*, 2006). En el caso de la interacción con células dendríticas, se han descrito la

actividad de distintos PRRs en función de la morfología fúngica, así como la modificación que produce en la fagocitosis y en la producción de citoquinas (Romani *et al.*, 2004).

## F. Herramientas genéticas

El hecho de que *C. albicans* sea un microorganismo diploide, en los que la mayoría de genes se expresa a partir de dos alelos presentes en cromosomas homólogos, la carencia de un ciclo sexual y la ausencia de plásmidos naturales, dificulta en buena medida la manipulación genética del hongo. A pesar de estas limitaciones, hasta la fecha se han desarrollado numerosos métodos de manipulación genética en *C. albicans*, gracias a los cuales es posible llevar a cabo el estudio de la función de diversos genes y que han permitido avanzar de forma muy importante en aspectos cruciales de la biología de este hongo.

La interrupción génica en *C. albicans* ha permitido identificar la función de gran cantidad de genes hasta el momento, así como su implicación en virulencia o en otros aspectos biológicos importantes. En este hongo no existen plásmidos endógenos, algo que sí ocurre en la levadura *S. cerevisiae*. Aunque en ocasiones se han construido plásmidos que contienen secuencias de replicación autónoma (ARS) (Cannon *et al.*, 1992; Kurtz *et al.*, 1987), éstos presentan una baja estabilidad y acaban por desaparecer (Pla *et al.*, 1995).

La eliminación de un gen en *C. albicans* puede lograrse mediante la integración en el genoma de una secuencia de ADN que porte los elementos de interés junto a un marcador que permita la selección positiva. Dicho marcador es generalmente nutricional o de auxotrofia, siendo *URA3* el más empleado. El gen *URA3* codifica la orotidina 5'-monofosfato (OMP) descarboxilasa, que cataliza la conversión de OMP en uridina 5'-monofosfato en la ruta de biosíntesis de pirimidina (Lay *et al.*, 1998). En 1993, Fonzi e Irwin describieron el protocolo a seguir para llevar a cabo la escisión de las dos copias de un gen mediante dos rondas de recombinación homóloga. El sistema se basa en la integración en el gen de interés de un casete que porta dos secuencias en tándem del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium* flanqueando al gen *URA3*. La recombinación entre las dos copias de *hisG* produce la expulsión del marcador nutricional y la consecuente auxotrofia para uracilo. La selección positiva se realiza en medio suplementado con el antimetabolito ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (Fonzi *et al.*, 1993).

Posteriormente, y usando esta metodología o similares, se obtuvieron cepas de *C. albicans* con más de una auxotrofia, como la cepa RM100 (Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>) (Negredo *et al.*, 1997). La obtención por este método de mutantes homocigotos y auxótrofos para uracilo posibilita su posterior manipulación genética, pudiendo integrar nuevas secuencias de ADN que contengan dicho marcador y realizando la selección positiva en medio sin el aminoácido.



Otro de los sistemas basados en el marcador *URA3* es el método de la flipasa desarrollado por el grupo del Dr. Morschhäuser, que usa como marcador de selección dominante el antibiótico nourseotricina (Park & Morschhauser, 2005). El casete empleado contiene el marcador del antibiótico (*SAT1*) que codifica la resistencia a nourseotricina junto al gen de la flipasa (FLP) de *C. albicans* (versión adaptada de la FLP del plásmido de 2 micras de *S. cerevisiae*), ambos flanqueados por secuencias de reconocimiento de esta enzima (FRT; *FLP recombination target sequence*). La inducción de la expresión del gen de la flipasa por crecimiento en un medio adecuado produce la expulsión del marcador *SAT1* mediada por recombinación específica de sitio. La sensibilidad de los transformantes positivos se manifiesta en el bajo crecimiento de éstos en medio con el antibiótico (Reuss *et al.*, 2004). Por su parte, el sistema Cre-loxP consiste en la recombinación específica entre dos elementos loxP catalizada por la recombinasa Cre (Dennison *et al.*, 2005; Shahana *et al.*, 2014). Recientemente, se ha descrito la utilización del sistema CRISPR, basado en la hibridación de secuencias cortas (sgRNA) con el genoma y la actividad específica de la enzima Cas9 dirigida a estas regiones. Este sistema ha mostrado ser eficiente en la obtención de mutantes homocigóticos tras una única transformación (Vyas *et al.*, 2015).

En *C. albicans* se han descrito diversos promotores regulables que permiten o bloquean la expresión del gen al que controlan en un medio de cultivo suplementado con compuestos que inducen o reprimen al promotor, respectivamente:

El promotor del gen *MET3* es uno de los más utilizados para la expresión condicional en *C. albicans*. *MET3* codifica una ATP sulfurilasa, responsable de asimilar el azufre inorgánico necesario para la síntesis de metionina y cisteína. Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, la expresión a partir de este promotor es reprimida en presencia de metionina, S-adenosil metionina y cisteína (Care *et al.*, 1999). *PCK1* codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, cuya expresión se reprime fuertemente por glucosa y se induce por succinato (Leuker *et al.*, 1997). Se ha empleado su promotor, por ejemplo, para sobreexpresar los genes *EFG1*, implicado en filamentación (Tebarth *et al.*, 2003) y *RAM2*, gen esencial (Song *et al.*, 2003). El promotor del gen *MAL2*, que codifica para la maltasa, es reprimido por glucosa e inducido por maltosa (Brown *et al.*, 1996). Su desventaja radica principalmente en la necesidad de modificar la fuente de carbono para regular el promotor, dado que esto interfiere en la fisiología y metabolismo del microorganismo, algo que ocurre en menor medida al añadir determinados aminoácidos (Care *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista técnico y metodológico, es deseable la regulación del gen de interés sin la necesidad de cambiar la composición del medio de crecimiento y de la forma que interfiera en la menor medida con la fisiología celular. En 1992 Gossen y Bujard describieron por primera vez el empleo de la tetraciclina como compuesto regulador de la expresión de un gen en células eucariotas. La fusión entre el represor *tetR*, originario de *Escherichia coli*, y la proteína VP16 del virus del Herpes simple genera un transactivador (tTA) capaz de reprimirse por tetraciclina. El transactivador se une a las secuencias *tetO* permitiendo la expresión del gen de interés de forma dependiente de la presencia de tetraciclina en el medio (Gossen *et al.*, 1992). Estos autores no solo describieron la

eficiencia del sistema, sino también su rapidez y el rango de concentraciones de tetraciclina requerida para su regulación. Este sistema tiene una gran aplicabilidad en muchos sistemas modelo.

De hecho, el grupo del Dr. Herrero, desarrolló en *S. cerevisiae* un grupo de vectores de expresión en los que la transcripción era controlada por un promotor híbrido (*tetO-CYC1*), regulado a su vez por un activador *tetR-VP16* (tTA). Se describieron distintos tipos de promotores y de activadores para este sistema en función del nivel de expresión deseado (Gari *et al.*, 1997). Este sistema, TET-OFF, se adaptó en el año 2000 a *C. albicans*, mediante la recodificación genética del transactivador (Nakayama *et al.*, 2000). Este sistema permite reprimir eficientemente la expresión génica en presencia de doxiciclina tanto *in vitro* como *in vivo* (durante una infección sistémica en ratón).

Las posteriores modificaciones genéticas han aumentado la versatilidad del sistema. Se han desarrollado variantes con una versión modificada del represor *tetR* fusionado al dominio de activación Gal4 de *S. cerevisiae* que funciona de forma inversa (rtTA) (TET-ON). En este caso, la construcción solo se une a cajas *tetO* en presencia de doxiciclina y tiene lugar por ello la transcripción constitutiva del gen que controla, que sólo es capaz de expresarse en presencia de tetraciclina. Este mecanismo se ha validado con la observación de la expresión regulada de GFP en levaduras e hifas, y también en células opacas (Park & Morschhauser, 2005).

Otra herramienta adicional ha sido el desarrollo de genes reporteros, que constituyen una herramienta esencial en biología molecular. Se utilizan, fundamentalmente, para estudiar los niveles de transcripción génica, visualizar células *in vivo*, seleccionar cepas mutantes y para analizar interacciones proteína-proteína y ADN-proteína entre otras aplicaciones. Sin embargo, y al igual que en la interrupción génica, existen una serie de limitaciones en su uso.

*C. albicans* presenta la particularidad de tener un código genético distinto del universal. La diferencia radica en el codón CTG, que en varias especies del género *Candida*, codifica el aminoácido serina en lugar de leucina (Ohama *et al.*, 1993; Yokogawa *et al.*, 1992). Por lo general, el empleo de un gen reportero conlleva la producción de una proteína heteróloga procedente de otro organismo. Esto supone un obstáculo importante dado que los mecanismos de procesar el ADN, el ARN y las proteínas pueden ser distintos entre unos organismos y otros. Además, la síntesis de proteínas no propias puede verse afectada por las modificaciones postraduccionales del organismo correspondiente, lo que a su vez influye en la estructura y función de la proteína en cuestión. Por este motivo algunos de los genes reporteros empleados en otros microorganismos no funcionan en *C. albicans*, sino que tienen que ser adaptados o rediseñados (Papon *et al.*, 2012). En la actualidad, se dispone de gran variedad de genes reporteros para cuantificar la expresión diferencial dependiente del promotor. Para ello, se han desarrollado diversos genes reporteros: las galactosidasas como *lacZ* de *E. coli* (Hermann *et al.*, 1992) y *LAC4* (Leuker *et al.*, 1997; Uhl *et al.*, 2001) y las luciferasas FLuc (Srikantha *et al.*, 1995), RLuc (Srikantha *et al.*, 1996) y CbLuc (Daniel Prieto, Tesis Doctoral) son algunos de los empleados.

Además de la expresión de genes reporteros, también se han desarrollado varios tipos de marcaje con proteínas fluorescentes, especialmente interesantes y útiles para la visualización del microorganismo directamente en tejidos del hospedador. Las proteínas fluorescentes tienen la capacidad de emitir luz a determinada longitud de onda sin necesidad de añadir sustratos externos. Esta luz se detecta al excitar con otra longitud de onda concreta y de mayor energía.

La proteína fluorescente verde GFP (*Green Fluorescent Protein*) procede de la medusa *Aequorea victoria* (Chalfie *et al.*, 1994) y es la más empleada en el marcaje de este tipo. Dado que es una proteína altamente estable, no tóxica y detectable con facilidad, se han desarrollado variantes (yEGFP3) adecuadas para su uso tanto en *C. albicans* como en *S. cerevisiae* (Cormack *et al.*, 1997).

Mediante distintas mutaciones en el gen de la GFP se han obtenido versiones similares de la proteína con distinto color en su fluorescencia. Se ha descrito el uso de la CFP (*Cyan*) en color azul (Heim *et al.*, 1994) y la YFP (*Yellow*) en color amarillo (Cubitt *et al.*, 1995). La posterior adaptación de sus secuencias permite su empleo en *C. albicans* (Gerami-Nejad *et al.*, 2001). Estas proteínas presentan ciertas limitaciones, debido a que los espectros de absorción y emisión se superponen parcialmente.

La proteína fluorescente roja DsRed, procedente del coral *Discosoma striata* (Matz *et al.*, 1999) presenta ciertas ventajas para ser empleada como reportero. Es una proteína altamente estable que, al emitir en una longitud de onda mayor que la de la GFP, puede ser visualizada a la vez que ésta en ensayos celulares y moleculares (Jakobs *et al.*, 2000). Se han desarrollado versiones de esta proteína para ampliar su versatilidad y optimizar sus propiedades, como la mRFP1 (Campbell *et al.*, 2002), las versiones mCherry y dTomato, con espectros mejorados de excitación-emisión (Shaner *et al.*, 2004) y la yEmRFP adaptada a levaduras (Keppler-Ross *et al.*, 2008).

En nuestro laboratorio, se ha rediseñado la secuencia del dTomato adaptando los codones para su expresión en *C. albicans*. La secuencia obtenida (<sup>Ca</sup>RFP) se integró en el genoma de una cepa silvestre empleando el sistema de regulación por tetraciclina, tanto en versión reprimible como inducible (Prieto *et al.*, 2014). Desde entonces, la <sup>Ca</sup>RFP es uno de los reporteros más empleados en nuestro grupo, tanto de forma aislada o en combinación con la GFP.

## 2. Estudio de la interacción *C. albicans* - hospedador

### A. Factores de virulencia

*C. albicans* es un microorganismo comensal y su capacidad de producir daño depende del estado inmunológico del hospedador, estableciéndose mecanismos complejos microorganismo-hospedador que condiciona el desarrollo o no de la infección. Entre los numerosos factores que contribuyen en la patogénesis del hongo destacan aquellos que promueven el crecimiento, la colonización, la invasión y la supervivencia del hongo en el hospedador. Muchos de los genes fúngicos implicados en estos procesos codifican componentes de la pared celular, ya que la estructura de ésta es clave para su adaptación al entorno y su supervivencia.

En el proceso patogénico se dan tres etapas diferentes aunque estrechamente interconectadas: adhesión, invasión y daño celular. La adhesión a los tejidos del hospedador es una fase fundamental, no sólo para durante la patogénesis sino también para la colonización. La fase de invasión se inicia a través de las microvellosidades epiteliales de la mucosa intestinal, y ocurre a través de endocitosis inducida (en la que participan receptores de células epiteliales y endoteliales) o entrada activa (que generalmente conlleva la filamentación) (Gow & Hube, 2012). Finalmente, el daño tisular surge en caso de una invasión interepitelial profunda acompañada de la secreción de enzimas (Wachtler *et al.*, 2011).

Algunos de los principales factores de virulencia que presenta *C. albicans* se detallan a continuación:

- La **capacidad de adhesión** a diferentes materiales o sustratos es esencial en la interacción con el hospedador. *C. albicans* posee múltiples adhesinas que median la unión de ésta a las células correspondientes. La familia de adhesinas ALS (Hoyer, 2001) incluye un total de 8 proteínas secretadas y con región de unión a GPI. Estas proteínas participan en la adhesión a células endoteliales, epitelio, fibrinógeno, fibronectina y laminina entre otros (Liu *et al.*, 2011) y también tienen un papel importante en la formación de *biofilms*. Otras adhesinas destacadas, como Hwp1 (Staab *et al.*, 1999), Mnt1 (Munro *et al.*, 2005) e Int1 (Gale *et al.*, 1998) también funcionan mediando la unión a células epiteliales, tal y como muestran la menor adhesión y virulencia de sus correspondientes cepas mutantes.
- La **secreción de enzimas** implicadas en invasión. Las aspartil proteasas secretadas (SAPs) son consideradas uno de los factores de virulencia más relevantes, ya que son capaces de dañar los tejidos del hospedador (Naglik, Challacombe, *et al.*, 2003a). La expresión de una u otra proteína de esta familia depende de las condiciones del entorno y en ocasiones de la morfología celular (SAP4-6 se expresan especialmente en hifas). Las SAPs también participan en la evasión al sistema inmune del huésped (Schaller *et al.*, 2001).

- El mecanismo de **switching** o cambio de morfología colonial. La transición *white-opaque* tiene cierta importancia en la patogenicidad (Kvaal *et al.*, 1999) aunque su función predominante parece ser el apareamiento de células diploides (Magee *et al.*, 2000).
- La formación de **biopelículas**, que son comunidades celulares estructuradas mediante una matriz de polímeros extracelulares tridimensional (Ramage *et al.*, 2005). Las biopelículas agrupan generalmente todas las morfologías de *C. albicans* (Nett *et al.*, 2006) y la matriz se compone de proteínas y de carbohidratos (Douglas, 2003), cuya función es mantener la estructura. Entre las características que adquieren las células que forman parte de una biopelícula destaca la elevada resistencia que presentan tanto al sistema inmunitario del hospedador (Kuhn *et al.*, 2004) como a la acción de antimicrobianos (Chandra *et al.*, 2001).
- Las **rutas de transducción de señales**. Las cascadas de señalización engloban todos aquellos mecanismos por los que la célula es capaz de transformar un estímulo externo en una respuesta específica, que conduce a modificaciones en su actividad. De este modo también se produce la respuesta de adaptación del patógeno al entorno del hospedador, controlando a su vez la expresión de otros factores de virulencia. Muchas rutas de transducción de señales descritas en *C. albicans* están relacionadas con su patogenicidad, como muestra la virulencia atenuada de cepas mutantes de elementos clave de las rutas (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Díez-Orejas *et al.*, 1997; Roman *et al.*, 2007).
- El **polimorfismo**. La filamentación de *C. albicans* se ha considerado durante mucho tiempo como un factor de virulencia fundamental, dado que ciertos mutantes incapaces de filamentar mostraban menor virulencia en modelos animales (Díez-Orejas *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 1997). Sin embargo, dado que mutantes hiperfilamentosos también muestran una reducida virulencia (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Braun, 1997) parece que el verdadero factor de virulencia es la versatilidad para llevar a cabo la transición levadura-hifa en las circunstancias adecuadas (Saville *et al.*, 2003b).

## B. Modelos animales

El estudio de las interacciones *Candida*-hospedador mediante el empleo de modelos animales ha sido ampliamente desarrollado gracias a los avances genómicos como son la disponibilidad de mutantes de *C. albicans* en genes de interés o la obtención de ratones transgénicos. Ello ha permitido el desarrollo de modelos animales de candidiasis, que son capaces de mimetizar, (hasta cierto punto y con algunas limitaciones), aspectos específicos de la infección fúngica. El estudio en animales (aunque no equiparable a los estudios sobre poblaciones humanas) permite una mayor facilidad en la toma de muestras, mayor control sobre los individuos y las condiciones de su entorno y la

posibilidad de hacer estudios de análisis causa-efecto. Algunos de los mejores modelos animales reproducen de forma fiel el mecanismo de virulencia e imitan los cambios inmunológicos o fisiológicos relacionados con la infección (de Repentigny, 2004). En la década de los años 60, Russel y Burch formularon el principio de las tres erres (RRR), basado en las consideraciones éticas necesarias para la mejora en la utilización de la experimentación animal. Las tres erres hacen referencia a diferentes alternativas en el uso de animales: el reemplazo (empleando métodos que eviten o sustituyan el uso de animales), la reducción (uso de herramientas que permitan minimizar el número de animales empleados, así como maximizar la información que se puede obtener de un solo animal) y el refinamiento (modificación de las condiciones o procedimientos para minimizar el dolor y mejorar el bienestar).

El empleo de animales invertebrados se ha incrementado en los últimos años, ya que ofrecen una serie de ventajas sobre el uso de mamíferos, pues permiten el estudio de un número elevado de cepas de *C. albicans* sin estar restringido por las consideraciones éticas y económicas asociadas a los estudios en mamíferos. Se han utilizado principalmente las especies *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Galleria mellonella* (Arvanitis *et al.*, 2013; Chamilos *et al.*, 2007; Junqueira, 2012; Mylonakis *et al.*, 2007). En el caso de insectos como *D. melanogaster*, la respuesta innata está bien caracterizada y conservada en relación a mamíferos. En *G. mellonella*, el sistema de fagocitosis se compone de hasta seis tipos de hemocitos, presentando ciertas similitudes con este mismo mecanismo en organismos superiores (Lionakis, 2011). Las larvas de esta especie son fáciles de obtener y pueden crecer a 37 °C, por lo que son adecuadas para estudiar la interacción con el hongo. Además, su gran tamaño en comparación con otros invertebrados facilita la inoculación directa de células del patógeno sin causar un daño relevante en el animal. Estos modelos invertebrados también han demostrado su utilidad para determinar el comportamiento en respuesta a nuevos antifúngicos (Mesa-Arango *et al.*, 2016a). Sin embargo, estos organismos presentan el inconveniente de carecer de una respuesta inmunitaria adaptativa, lo que limita su utilidad en estudios de interacción patógeno-hospedador. Ésta y otras diferencias con humanos hacen que en ocasiones sea complicado extrapolar datos con los modelos desarrollados en mamíferos. A pesar de ello, la combinación de datos obtenidos de modelos vertebrados y no vertebrados podría aumentar el conocimiento sobre las infecciones por hongos oportunistas.

Los principales mamíferos empleados en el estudio de la infección fúngica son las ratas y los ratones, aunque también se han empleado en ocasiones hámsters e incluso monos (Samaranayake *et al.*, 2001). El uso de roedores se basa principalmente en su similitud anatómica e inmunológica con el ser humano, lo que supone la existencia de multitud de modelos y herramientas que han sido desarrolladas en estos animales. En el hospedador, *C. albicans* se establece principalmente en la mucosa oral, la vaginal y la gastrointestinal, y para cada localización se han descrito distintos modelos animales.

En el caso de los modelos oro-faríngeos de candidiasis (OPC) se han desarrollado algunos de gran relevancia en ratón que, generalmente, difieren en el modo de iniciar la colonización y en los que se cuantifica la colonización por recuento de CFUs por gramo de



lengua del animal (Conti *et al.*, 2010). Algunos modelos también hacen uso de tratamientos antibióticos o inmunodepresores que faciliten el establecimiento de *Candida* (Kamai *et al.*, 2001). Una de las ventajas principales de la rata es tanto el tamaño de su cavidad oral como el hecho de que la lengua de estos animales es fácilmente colonizada por *C. albicans*, lo que permite el estudio de las lesiones orales formadas. Sin embargo, presenta desventajas en el estudio del comensalismo, ya que la presencia de *C. albicans* como comensal es más rara que en el ser humano. A diferencia de la rata, el ratón no es hospedador natural de *C. albicans* (Iliev *et al.*, 2012).

Otro de los modelos ampliamente utilizados ha sido los vaginales tanto en rata como en ratón. En algunos modelos vaginales en ratón se realiza un tratamiento con 17- $\beta$ -estradiol previamente a la infección vaginal. Dicho tratamiento se mantiene durante todo el ensayo realizado para mantener un estado de pseudo-estro (Clemons *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2013). El tratamiento hormonal afecta a las células dendríticas de tal manera que la respuesta T<sub>H</sub>17 se atenúa aumentando la susceptibilidad a las infecciones por *Candida* (Relloso *et al.*, 2012).

El modelo de comensalismo gastrointestinal se basa en el establecimiento de *C. albicans* en el intestino tras su entrada por vía oral, desde donde puede producirse una diseminación sistémica. En ratón, la microbiota del tracto gastrointestinal no contiene *C. albicans* de forma natural, lo cual es una ventaja sobre otros hospedadores, ya que su respuesta inmunitaria puede verse menos influenciada por una respuesta anterior hacia el hongo (Samaranayake *et al.*, 2001). En la gran mayoría de modelos murinos desarrollados se emplea un tratamiento antibiótico que permite que se establezca la colonización por una reducción de la microbiota del intestino (Koh *et al.*, 2008; Tansho *et al.*, 2004). Este tratamiento antibiótico se puede evitar alterando de forma fisiológica la microbiota intestinal mediante una alimentación específica (Yamaguchi *et al.*, 2005) o bien empleando ratones gnotobióticos (Balish *et al.*, 1990; Rahman *et al.*, 1995).

Algunos modelos en ratón utilizan este modelo de comensalismo gastrointestinal para estudiar la candidiasis diseminada utilizando un inmunosupresor (ciclofosfamida) seguida de una inoculación intravenosa del hongo (Andes *et al.*, 2003) o, simplemente, inóculos muy altos de células. Se ha descrito que la diseminación del hongo directamente desde el intestino tras la colonización puede tener lugar mediante la depleción de los neutrófilos y la alteración de funcionalidad de la mucosa (Koh *et al.*, 2008). Otros modelos se han centrado en establecer una candidiasis crónica en mucosa (CMC) a nivel gástrico sin la necesidad de tratamiento con antibióticos, con el objetivo de analizar principalmente las alteraciones a nivel inmunitario (Cenci *et al.*, 1995).

Por último el modelo de infección sistémica de ratón se ha llevado a cabo normalmente por inyección directa en sangre. Este modelo ha sido de gran utilidad para identificar y analizar la función de numerosos factores de virulencia del hongo (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Csank *et al.*, 1997; Diez-Orejas *et al.*, 1997).

Una alternativa al uso de animales en investigación es el desarrollo de modelos *ex vivo* que emplean órganos o tejidos del animal tras su sacrificio. El uso de órganos

perfundidos, por ejemplo, se ha aplicado en el estudio de numerosos aspectos farmacológicos y toxicológicos (Gordon *et al.*, 1972; Groneberg *et al.*, 2002). En la década de 1970 ya se emplearon hígados perfundidos de roedores en modelos de infección bacteriana y de *C. albicans* para analizar su eliminación progresiva del torrente sanguíneo (Moon *et al.*, 1975; Sawyer *et al.*, 1976). Recientemente, también se ha utilizado un modelo similar en cerdo para describir los genes implicados en la invasión fúngica (Thewes *et al.*, 2007).

## C. Respuesta inmunitaria

La respuesta inmunitaria, como hemos indicado anteriormente, es esencial para controlar la infección fúngica. Una respuesta inmunitaria eficaz supone, en primer lugar, el reconocimiento del patógeno, tras lo cual se genera la respuesta específica con el objetivo de eliminarlo. La respuesta inmunitaria consta de una primera respuesta innata seguida de una respuesta adquirida o adaptativa; ambas constan de una fase de reconocimiento y de una fase efectora.

### a) Respuesta innata

La respuesta innata se caracteriza por ser una respuesta muy eficiente en la eliminación de organismos patógenos. Es la primera línea de defensa, por lo que su activación es fundamental, así como los mecanismos que desencadena. La fase de reconocimiento del patógeno conlleva el proceso de presentación antigénica (necesario para la activación de la respuesta adaptativa) a la vez que produce una respuesta inflamatoria, en la cual se activan las células fagocíticas, el sistema del complemento y los péptidos antimicrobianos.

El tipo de respuesta innata tiene un importante papel en la iniciación y determinación del tipo de respuesta adaptativa que se generará posteriormente (Romani, 2011). Los receptores que participan en la respuesta innata no están distribuidos clonalmente, sino que todas las células de un mismo tipo expresan un determinado repertorio de receptores. Esto conlleva que la respuesta sea rápida, a diferencia de la respuesta adaptativa que requiere de la expansión clonal de linfocitos.

La primera interacción se basa en el reconocimiento del patógeno por parte de los componentes de la inmunidad innata, a través de los patrones moleculares asociados a patógeno (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* o PAMPs) (Janeway, 1992). Estos receptores son estructuras muy conservadas en la superficie del microorganismo y reconocidas de manera específica por los receptores PRR (*Pattern Recognition Receptor*), localizados en la superficie de las células inmunitarias. La interacción entre ambos tipos de receptor genera diferentes respuestas frente al microorganismo patógeno. La pared fúngica es rica en PAMPs y mientras que las proteínas de pared tienen un papel clave en la adhesión a superficies, los polisacáridos intervienen en el reconocimiento inmunitario (Netea, Brown, *et al.*, 2008). Sin embargo, algunas proteínas como las aspartil proteasas



(SAPs), secretadas o asociadas a la pared, pueden ser reconocidas por las células inmunitarias e inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias (Pietrella *et al.*, 2010).

Las proteínas de la pared celular pueden ser antígenos de gran relevancia; de hecho algunas se han empleado en los últimos años para el desarrollo de vacunas, como los dominios terminales de Als1 y Als3 (Spellberg, Ibrahim, *et al.*, 2006). Los polisacáridos de la pared celular de *C. albicans* son reconocidos por dos familias de PRRs: los receptores de tipo Toll (TLRs) y los receptores de lectina tipo C (CLRs). Los TLRs median la liberación de citoquinas proinflamatorias a través del reconocimiento de estructuras microbianas. Los receptores TLR2 y TLR4, son los principales en la señalización inducida por *C. albicans* (Netea *et al.*, 2006), reconocen fosfolipomananos y mananos anclados mediante enlace O-glicosídico (O-mananos) respectivamente, y modulan la respuesta inflamatoria y adaptativa (Jouault *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2006; Netea, van de Veerdonk, *et al.*, 2008; Tada *et al.*, 2002). Además, cooperan con otros receptores (a través de heterodímeros TLR2) en el reconocimiento de ciertos PAMPs (Romani, 2011). Por otro lado, TLR1 y TLR6 muestran funciones secundarias y no parecen ser esenciales para la respuesta frente al hongo (Netea, van de Veerdonk, *et al.*, 2008).

El contenido en manano de la pared también es reconocido por receptores de tipo CLR. Concretamente, los mananos anclados mediante enlace N-glicosídico (N-mananos) son reconocidos por receptores de manosa en macrófagos (Netea *et al.*, 2006) y por DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*) (Cambi *et al.*, 2003) y tanto los  $\alpha$ -mananos como las estructuras con alto contenido en manosa presentes en hifas son reconocidos por Dectin-2 (Saijo *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2006). Por otro lado Dectin-1 también es un receptor de tipo CLR, que reconoce estructuras altamente conservadas de  $\beta$ -glucano. Es expresado en varios tipos de células inmunitarias, como monocitos, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas (Brown *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2002). Entre otros tipos de receptores de tipo CLR cabe destacar la acción de las lectinas de unión a manosa (MBL), las cuales se unen a manosa, fucosa y a grupos N-acetil-glucosamina presentes en glicoproteínas y glicolípidos de la superficie del microorganismo (Turner *et al.*, 2000). Su principal función parece ser la activación del complemento por la vía de las lectinas. Galectina-3 es otra lectina implicada en el reconocimiento de  $\beta$ -(1,2)-oligomanósidos en la superficie de *C. albicans* (Fradin *et al.*, 2000). Dicho reconocimiento participa en la discriminación entre hongos patógenos o no patógenos (Kohatsu *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2016; Roman *et al.*, 2016).

El reconocimiento de estos PAMPs, mediado por receptores PRR de las células inmunitarias, produce la activación de rutas de señalización que estimulan la producción de citoquinas, la fagocitosis y potencian la acción fungicida.

En el primer contacto con el patógeno participan varias poblaciones celulares como los fagocitos (monocitos, macrófagos y neutrófilos), las células *natural killer* (NK) circulantes y las células dendríticas. Los neutrófilos son el primer tipo celular reclutado al foco de infección y junto con los macrófagos son las principales células efectoras implicadas en la respuesta inmune innata. La fagocitosis de las células fúngicas se produce tras el

reconocimiento directo a través de varios receptores, como los de manosa, o en el caso de opsonización del hongo está mediado por receptores del complemento y de fragmentos Fc de las inmunoglobulinas (Netea, Brown, *et al.*, 2008).

Los cambios transcripcionales llevados a cabo por *C. albicans* durante la fagocitosis por macrófagos permiten diferenciar dos etapas en el proceso. La primera etapa se caracteriza por una serie de cambios en el metabolismo del carbono, durante los cuales las células pasan de un metabolismo glucolítico a gluconeogénico. Además, se produce una disminución en la expresión de genes responsables de la traducción de proteínas. Las alteraciones metabólicas causadas por la menor disponibilidad de nutrientes son una parte importante en esta respuesta temprana frente a la fagocitosis. En la segunda etapa, la célula vuelve a llevar a cabo la glucólisis y la expresión normal de genes implicados en traducción. Esta segunda fase además coincide con el momento en que se dispara el proceso de filamentación (Lorenz *et al.*, 2004). En el caso del mutante *efg1 cph1*, al ser incapaz de filamentar, tampoco lleva a cabo esta etapa tardía, lo que demuestra que las alteraciones metabólicas y morfológicas son independientes durante la fagocitosis. La expresión de genes específicos de filamentación, como *HWP1* y *ECE1* (Birse *et al.*, 1993; Staab *et al.*, 1998), no se ve alterada en el curso de la interacción con las células fagocíticas. Por ello, se considera que la filamentación durante este proceso se produce por diversos factores, siendo la fagocitosis un estímulo adicional.

Tras el reconocimiento del hongo por parte de estas células se produce una cascada de transducción de señales que tiene como consecuencia la producción de mediadores de la inflamación, la sobreexpresión de moléculas de adhesión de la superficie celular, la fagocitosis del patógeno y la producción de compuestos tóxicos como especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) (Gil *et al.*, 2009; Netea *et al.*, 2010). La destrucción del hongo incluye en ocasiones mecanismos oxidativos, como es la producción de óxido nítrico (NO) (Romani, 2011). Otros mecanismos no oxidativos implican la acción de diferentes enzimas para eliminar al patógeno, como la lisozima, la cathepsina G y la lactoferrina (Reeves *et al.*, 2002). La activación de macrófagos por varias citoquinas, entre las que destaca el IFN- $\gamma$ , es necesaria para su actividad anti-*Candida* (Vazquez-Torres *et al.*, 1997).

Las células dendríticas enlazan la respuesta innata con la adaptativa. Son células presentadoras de antígeno profesionales que intervienen en la activación y diferenciación de células T en diferentes subpoblaciones celulares, con la consecuente liberación de un patrón de citoquinas específico. Las DCs expresan una amplia variedad de PRRs, secretan citoquinas y presentan el antígeno a los linfocitos T que seguidamente comienzan su diferenciación (Steinman, 2012). Se han identificado varias subpoblaciones de DCs en base a su función y a sus receptores de superficie, siendo las más relevantes las células dendríticas mieloides o convencionales (cDCs) y las plasmacitoides (pDCs). Las pDCs se caracterizan por producir IFN- $\alpha$  y por su especificidad antivírica (Reizis *et al.*, 2011). Las cDCs se originan en la médula ósea y provienen del mismo precursor que da lugar a granulocitos y macrófagos. Ambas subpoblaciones expresan receptores de tipo TLR, CLR y FcR (Benko *et al.*, 2008; Steinman, 2012) y son responsables de la

presentación de antígeno a los linfocitos T restringidos por el sistema de histocompatibilidad (MHC-I y MHC-II). Así mismo, difieren en numerosos aspectos, incluyendo su distribución tisular, su producción de citoquinas y los factores de crecimiento necesarios para su diferenciación. Las células dendríticas que expresan DC-SIGN se localizan fundamentalmente en la submucosa de los tejidos, dónde entran en contacto con los patógenos. Esta molécula de adhesión puede inducir señalización intracelular a través de la ruta de la Raf-quinasa, modulando así las respuestas mediadas por receptores TLR e induciendo a su vez altos niveles de la citoquina inmunosupresora IL-10 (Gringhuis *et al.*, 2007; Hodges *et al.*, 2007).

Uno de los mecanismos más importantes llevados a cabo por las células inmunitarias tras el reconocimiento de un patógeno es la liberación de citoquinas. Como se ha señalado antes, son los microorganismos patógenos los que inducen la secreción de citoquinas a través de señales comunicadas por receptores a los que se unen para ser fagocitados. Es destacable la acción proinflamatoria de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18, secretadas por células fagocíticas inmediatamente tras su interacción con *C. albicans* (Presterl *et al.*, 1999), responsables del reclutamiento de los neutrófilos al sitio de infección. La IL-6, también producida por macrófagos activados, contribuye en gran medida a la fase aguda de la respuesta, además de participar en la activación de linfocitos y aumentar la producción de anticuerpos. El TNF- $\alpha$  es una citoquina esencial para el control de la candidiasis, ya que su neutralización favorece el avance de ésta (Netea *et al.*, 1995). Participa en la quimiotaxis de las células fagocíticas, a las cuales activa desencadenando el estallido respiratorio e induciendo la expresión de otras moléculas estimuladoras (Parameswaran *et al.*, 2010). La IL-10 es secretada por las células NK y junto con el TGF- $\beta$  inhibe la actividad de los linfocitos T, por lo que es considerada una citoquina no inflamatoria. Sus niveles también pueden afectar a la diferenciación de DCs así como a la maduración de linfocitos B.

## b) Respuesta adaptativa

Como consecuencia de un proceso infeccioso en el que la respuesta innata (primaria o de contención) no ha sido suficiente para controlar el crecimiento del patógeno, se pone en marcha la respuesta inmunitaria adaptativa, más específica, potente y expeditiva. Los linfocitos son las células de la inmunidad adaptativa que se encargan de llevar a cabo esta respuesta específica; son de dos tipos, los linfocitos B (LB) o células productoras de anticuerpos y los linfocitos T (LT). A su vez, existen dos subpoblaciones de linfocitos T pueden los inmunomoduladores o citotóxicos, en función de si presentan las moléculas coestimuladoras CD4+ o CD8+ en su superficie, respectivamente. El inicio de dicha respuesta comienza tras el proceso denominado presentación antigénica, en el que ciertas células de respuesta inmunitaria innata “presentan” los péptidos antigénicos a los linfocitos T vírgenes en lugares restringidos como son los órganos linfoides secundarios. Los linfocitos T no reconocen directamente al patógeno sino que reconocen péptidos antigénicos presentados por una célula presentadora de antígeno y restringido por el MHC. Tras dicho reconocimiento se produce la activación y diferenciación en linfocitos T

efectores y de memoria. La respuesta inmunitaria adaptativa mediada por linfocitos T se conoce como respuesta celular. En el caso de los linfocitos B tras su activación se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos y en células de memoria. Los anticuerpos constituyen la parte humoral de la inmunidad adaptativa

### **b.1. Respuesta celular**

Los linfocitos T desempeñan una función clave en la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans* mediante la secreción de citoquinas que controlan el desarrollo y la actividad de los efectores inmunitarios. Así, tras la unión TCR y su co-receptor (CD4/CD8) al complejo MHC-péptido antigénico se produce la activación y proliferación clonal. La tercera señal se produce de forma concomitante y es debida a la unión de las diferentes citoquinas secretadas por las APCs (mayoritariamente células dendríticas), a receptores específicos de la superficie del linfocito T. Esta última señal es la que provoca la diferenciación en el linfocito T dando lugar a diferentes subpoblaciones de células efectoras. Estos linfocitos efectores tienen distintas funciones, lo que permite una gran plasticidad en la respuesta de los linfocitos T necesaria para responder eficazmente frente a una gran diversidad de patógenos:  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  o T reguladoras ( $T_{reg}$ ). Por último es importante señalar que una población de linfocitos T activados y efectores es la que quedará posteriormente como linfocitos T de memoria.

Mientras que la producción de IFN- $\gamma$  induce la diferenciación de linfocitos  $T_H1$ , la secreción de IL-4 hace que se diferencien en linfocitos  $T_H2$ . Por otra parte, la presencia de citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 favorece la aparición de linfocitos  $T_H17$ . Mientras que la respuesta de tipo  $T_H1$  en general parece proteger frente a la infección fúngica, la respuesta de tipo  $T_H2$  resulta más dañina para el hospedador y no protege (Casadevall *et al.*, 1998; Polonelli *et al.*, 2000; Romani, 1999a, 1999b). Así, el balance de las respuestas  $T_H1/T_H2$  se relacionaba con la resistencia/sensibilidad a la infección fúngica. Así, la diferenciación a células de tipo  $T_H2$ , que liberan IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, se relaciona con una mayor susceptibilidad a las infecciones fúngicas y una reducción de la capacidad fungicida (Huffnagle *et al.*, 2003). La respuesta de tipo  $T_H1$ , que secretan principalmente IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , activan a las células fagocíticas favoreciendo así la eliminación del patógeno, mientras que las células  $T_H2$  intentan inhibir el desarrollo de la respuesta  $T_H1$  y por tanto también dicha actividad fagocítica (Romani, 2011). Además de un equilibrio adecuado entre ambos tipos de respuesta es necesaria la actividad de las células T  $CD4^+ CD25^+$  reguladoras (células  $T_{reg}$ ). Este tipo celular, en respuesta a la liberación de IL-10, produce más IL-10 y TGF- $\beta$ , limitando la respuesta de tipo  $T_H1$  y evitando así una exacerbada respuesta inmune.

La identificación de la subpoblación de linfocitos  $T_H17$  en el año 2005 supuso un gran cambio en el conocimiento de la respuesta inmune frente a enfermedades infecciosas. Se describió por primera vez una subpoblación de linfocitos  $T_H$  cuyo desarrollo era inhibido por IFN- $\gamma$  y por IL-4 (citoquinas precursoras de las poblaciones  $T_H1$  y  $T_H2$  respectivamente) y mediado por IL-23 e IL-6. Los linfocitos  $T_H17$  producen las citoquinas IL-17A, IL-17F e IL-22 (Harrington *et al.*, 2005; Park, Li, *et al.*, 2005). Aunque inicialmente

la producción de IL-17 se detectó únicamente en linfocitos T, posteriormente se ha observado también en otros tipos celulares (Cua *et al.*, 2010). En los últimos años se ha relacionado la activación de la respuesta T<sub>H</sub>17 en la protección frente a infecciones fúngicas, especialmente a nivel de mucosas (Curtis *et al.*, 2009). La IL-17 induce la producción de quimiocinas en los lugares de infección y provoca el reclutamiento de neutrófilos hacia dicho sitio. Se ha descrito la relación entre la deficiencia del receptor de la IL-17 y la susceptibilidad a candidiasis sistémica, lo cual puede ser debido a una disminución en la cantidad de neutrófilos reclutados (Huang *et al.*, 2004).

Como hemos comentado previamente el reconocimiento diferencial de células levaduriformes o de las hifas inducen la liberación de diferentes citoquinas por las APCs. Así se ha descrito para el caso de *C. albicans* que mientras que ambas morfologías inducen la síntesis de IL-1 $\beta$ , únicamente las hifas inducen la producción de IL-23 e IL-6. En células mieloides, la activación y maduración de IL-1 $\beta$  requiere un procesamiento por parte de la caspasa-1. Ambas morfologías producen pro IL-1 $\beta$ , sin embargo sólo las hifas inducen caspasa-1 y por tanto son capaces de liberar la citoquina, que a su vez permite el establecimiento de la población T<sub>H</sub>17 y el reclutamiento de neutrófilos (Cheng *et al.*, 2011). Por otra parte también se ha descrito cómo las células T<sub>H</sub>17 y sus citoquinas liberadas (IL-17A, IL-17F e IL-22) presentan la capacidad de discriminar colonización e invasión de *C. albicans* (van de Veerdonk *et al.*, 2009). Por tanto, la transición de comensal a patógeno activa la respuesta T<sub>H</sub>17 protectora de mucosa. Aunque se considera que la citoquina IL-17 presenta un papel protector en la respuesta inmune, al inducir el reclutamiento de neutrófilos puede llegar a ejercer un efecto inflamatorio en infecciones gástricas causadas por el hongo (Zelante 2007). Además, se ha descrito cómo la actividad de las células T<sub>H</sub>17 junto con la IL-23 actúan como reguladores negativos de la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans* (Zelante 2007).

## **b.2. Respuesta humoral**

La activación de la población de linfocitos B necesita de la colaboración de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (previamente activados tras el reconocimiento de antígenos a través de sus receptores de membrana). La interacción entre ambos tipos celulares desencadena la proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas que posteriormente secretan las inmunoglobulinas específicas. Algunos de los linfocitos efectores permanecerán como linfocitos B de memoria manteniendo niveles protectores de anticuerpos circulando.

Los anticuerpos, además de reconocer y neutralizar a los patógenos, pueden opsonizarlos para facilitar dicho reconocimiento y así colaborar en su eliminación. No sólo son específicos del tipo de antígeno al que reconocen, sino también en cuanto al tipo de respuesta que promueven (fagocitosis, activación del complemento, secreción de elementos mediadores, etc.). Las inmunoglobulinas son capaces de unir componentes de pared para ser reconocidas mediante sus dominios genéricos Fc por la familia de receptores de fragmentos Fc (Ravetch *et al.*, 1998). En *C. albicans* se ha descrito que la

IgG anti-manano favorece la fagocitosis, opsonización y muerte del hongo por parte de neutrófilos humanos (Kozel *et al.*, 2004).

En la actualidad, la función protectora de los anticuerpos continúa siendo evaluada. Se considera que un anticuerpo es protector cuando cumple alguna de las siguientes funciones: previene la adhesión, neutraliza las toxinas, induce opsonización o provoca citotoxicidad celular mediado por las células NK (Bikandi *et al.*, 2000). Así, la contribución de los anticuerpos en la resolución de las candidiasis cada vez está más aceptada por la comunidad científica ya que numerosos estudios han demostrado la protección que presentan ciertos anticuerpos específicos en el curso de una candidiasis sistémica o en mucosas (Matthews *et al.*, 2001).

Los anticuerpos generados frente a proteínas de la familia SAP han resultado ser protectores en un modelo de candidiasis vaginal a través de la neutralización de la actividad enzimática (Naglik, Challacombe, *et al.*, 2003b). Así mismo, se ha descrito la actividad de un anticuerpo monoclonal específico frente a manano, que mediante la unión a éste favorece el reconocimiento de la célula y su fagocitosis (De Bernardis *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1999). El empleo de anticuerpos monoclonales también se ha utilizado para el reconocimiento específico de la forma filamentosa del hongo, empleando un anticuerpo dirigido a manoproteínas específicas de hifas (Moragues *et al.*, 2003).

Las proteínas de la pared celular y manoproteínas inducen una fuerte respuesta humoral que incluye ciertos anticuerpos con papel protector (Casadevall, 1995; Casadevall *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 1998). Es por ello que algunas estrategias recientes en el desarrollo de vacunas se centran en estas proteínas de la superficie celular.

Aunque los mecanismos de protección que muestran algunos anticuerpos no se conocen con precisión, éstos pueden estar relacionados con la filamentación, la opsonización y la adhesión (Casadevall, 1995). La inhibición de la adhesión a superficies de células inmunitarias es uno de los procesos mediado por la acción de anticuerpos (Bendel *et al.*, 1993; Fidel, 1999; Martinez *et al.*, 1998; Umazume *et al.*, 1995). Sin embargo los anticuerpos también han mostrado funciones independientes de la defensa del hospedador frente al hongo, pudiendo incluso contribuir a la proliferación de éste (Magliani, Conti, de Bernardis, *et al.*, 1997; Polonelli *et al.*, 1997).

## **D. La proteómica como herramienta en el estudio de - enfermedades infecciosas -**

El término “proteoma” se utilizó por primera vez en 1995 (Wilkins, 1995) y se conoce como la dotación completa de proteínas expresadas por un organismo, tejido, cultivo celular, etc., en un momento concreto y bajo determinadas condiciones de crecimiento. A diferencia del genoma, el proteoma es más dinámico, puesto que una misma información genética normalmente da lugar a distintos proteomas en función de las condiciones experimentales en que se encuentre el organismo.



La proteómica es la ciencia que analiza el proteoma y se clasifica en diferentes tipos según su objetivo de estudio. La proteómica de expresión identifica los elementos del proteoma que sufren alteraciones en sus niveles de expresión causadas por agentes externos, la proteómica celular o estructural estudia la localización subcelular de las proteínas y las interacciones entre ellas y proteómica analítica o funcional estudia una clase determinada de proteínas proporcionando información acerca de su señalización o modificaciones post-transduccionales (entre otros). Los estudios que emplean la proteómica se basan principalmente en técnicas de separación, identificación y caracterización de proteínas. El apoyo bioinformático es fundamental para la integración de los datos obtenidos y su posterior análisis e investigación.

Debido a la gran complejidad del proteoma de la mayoría de organismos, la aplicación de técnicas proteómicas requiere la separación previa de proteínas para facilitar el posterior análisis. Una de las técnicas de separación más relevantes y empleadas es la electroforesis bidimensional, que separa las proteínas en función de dos parámetros, su punto isoeléctrico y su peso molecular. En la primera dimensión la separación se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF) y las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH hasta alcanzar un lugar en que su carga neta (o punto isoeléctrico, pI) es cero. Posteriormente, en una segunda dimensión, las proteínas se separan en función de su peso molecular mediante electroforesis desnaturalizante en presencia de SDS (Laemmli, 1970). Dado que la dirección del movimiento de esta segunda dimensión es perpendicular al de la primera, se genera un mapa o patrón en el que se pueden visualizar todas las proteínas separadas al tñirlas con reactivos adecuados, como el azul de Coomassie, plata o compuestos fluorescentes.

Entre los métodos de identificación de proteínas, el más destacable debido a su rapidez y alta sensibilidad es la espectrometría de masas (Patterson, 2001). Es una técnica analítica clásica que permite identificar los elementos químicos que forman un compuesto o el contenido en isótopos atómicos, separando los iones del compuesto en fase gaseosa basándose en su relación masa/carga. A través de este método es posible la caracterización de modificaciones post-traduccionales de especial interés, como fosforilación, ubiquitinación o glicosilación, entre otras. Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos principales: una fuente de ionización (que convierte la muestra en iones en forma gaseosa), un analizador de masa (que los analiza y separa) y un detector (que recibe los datos y los procesa junto con programas informáticos específicos).

Una de las aplicaciones más útiles de la proteómica es el estudio del perfil de expresión de proteínas por parte de un mismo organismo en distintas condiciones o estados celulares. La comparación de ambos perfiles es clave para estudiar las diferencias fisiológicas entre ambas. Este tipo de estudios se basan en ocasiones en la comparación entre geles bidimensionales, en los que se separan los extractos proteicos obtenidos de células en las condiciones de interés. Mediante esta técnica, el tamaño y la intensidad de las manchas proteicas se relacionan directamente con la cantidad de proteína presente en cada condición de crecimiento.

El uso de técnicas proteómicas en la investigación de *C. albicans* fue iniciado hace años con el trabajo pionero de Manning y cols. comparando los extractos citoplasmáticos procedentes de hifas y levaduras separados en geles bidimensionales (Manning *et al.*, 1980). Desde entonces se han desarrollado múltiples estudios que utilizan la tecnología proteómica, tanto de forma cualitativa como cuantitativa, para la caracterización del proteoma del hongo. La publicación de la secuencia completa del genoma en la base de datos “*Candida DataBase*” en 2004 ha sido una herramienta importante para el avance estos estudios.

La transición de levadura a hifa, esencial en la biología de este hongo, ha sido objeto de numerosos estudios proteómicos, algunos de ellos han sido realizados en nuestro departamento (Hernandez *et al.*, 2004; Monteoliva *et al.*, 2011; Vialas *et al.*, 2012), al tiempo que se ha construido la base de datos Compluyeast.

En otros estudios se han analizado mutantes alterados en la transición morfológica, como los que presenta *efg1* habiéndose caracterizado proteínas que muestran un comportamiento diferencial en dicho mutante en relación a una cepa silvestre, algunas de ellas implicadas en adhesión (Saville, Thomas, *et al.*, 2006). En el caso del mutante *ndh51*, que también presenta alteraciones morfológicas, se han identificado la sobreexpresión de varias proteínas implicadas en el metabolismo respiratorio, especialmente en Pdx1, elemento esencial en el complejo piruvato deshidrogenasa (Vellucci *et al.*, 2007). El análisis del proteoma en función de la morfología de *C. albicans* ha permitido identificar numerosas proteínas tanto de superficie como citoplásmicas. Así, se han descrito ciertas proteínas específicas de levadura y de hifa, así como de células obtenidas de biopelículas (Martinez-Gomariz *et al.*, 2009). Además, se han identificado proteínas implicadas en la inducción de la filamentación en presencia de suero (Aoki *et al.*, 2013). La detección de antígenos de superficie expresados en hifas también se ha realizado *in vivo* en un modelo de candidiasis diseminada en conejo (Saez-Roson *et al.*, 2014).

Uno de los principales objetos de estudio de la proteómica de *C. albicans* han sido las proteínas de la pared celular (Castillo *et al.*, 2008; de Groot *et al.*, 2004). La constante remodelación de la pared celular ante distintas condiciones ambientales hace que el proteoma de la pared también muestre modificaciones (Pitarch *et al.*, 2002). Así, se han descrito aquellos cambios que presenta este proteoma frente a condiciones de variación de pH o de inducción de la filamentación (Ebanks *et al.*, 2006; Heilmann *et al.*, 2011; Sosinska *et al.*, 2011). Recientemente se ha desarrollado una nueva estrategia proteómica basada en la digestión triptica o “afeitado” de los péptidos extracelulares de la superficie celular, lo que permite una mejor y más precisa identificación de proteínas de superficie (Gil-Bona *et al.*, 2015; Hernaez *et al.*, 2010; Vialas *et al.*, 2012). Esta nueva técnica ha permitido la identificación de nuevas proteínas de superficie implicadas en filamentación, en la integridad de la pared celular, en respuesta a estrés y en interacción con macrófagos. Otros estudios han empleado la tecnología proteómica en el estudio de la adaptación metabólica de *C. albicans* y su consecuente modificación del proteoma y secretoma (Ene *et al.*, 2012). Por otro lado, la proteómica también ha permitido el estudio



de la respuesta del hongo tras la interacción con macrófagos, así como la identificación de proteínas relacionadas con las defensas del hospedador (Fernandez-Arenas *et al.*, 2007; Reales-Calderon *et al.*, 2012).

Por último otra de las aplicaciones de la proteómica ha sido la inmunoproteómica o análisis de la respuesta serológica (SERPA), que se basa en la combinación de la electroforesis bidimensional con el *western-blotting* y espectometría de masas. Utilizando esta aproximación se ha analizado la respuesta de anticuerpos frente a *C. albicans*, tanto utilizando modelos animales como pacientes (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004a; Pitarch *et al.*, 2001). El análisis de estas muestras serológicas ha posibilitado la determinación de ciertos marcadores específicos de candidiasis que podrían ser empleados tanto para el diagnóstico como en el desarrollo de futuras vacunas (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004b; Pitarch *et al.*, 2006; Pitarch *et al.*, 2011, 2014, 2015).

## Objetivos

---



El dimorfismo es uno de los aspectos más estudiados en el hongo patógeno *C. albicans*, no sólo por ser una de las características principales que condicionan su forma de crecimiento, sino por su implicación en virulencia. Hasta la fecha, se han descrito numerosos estudios que relacionan la filamentación del hongo con un aumento en la capacidad de invasión de tejidos y con el desarrollo de candidiasis sistémica. Sin embargo, la implicación de este mecanismo en el papel como comensal de *C. albicans* era prácticamente desconocida en el inicio de este trabajo experimental.

Los ensayos que estudian la filamentación durante la colonización intestinal normalmente emplean cepas mutantes alteradas en su morfología, incapaces de formar hifas o bien que presentan un crecimiento filamentoso constitutivo. En este trabajo nos planteamos el uso de una misma cepa que pueda presentar ambas morfologías, siendo regulada la transición de una a otra a voluntad del experimentador. Para ello hemos hecho uso del sistema de regulación por tetraciclina sobre la expresión del gen *TUP1*, un fuerte represor del crecimiento filamentoso de *C. albicans*. El empleo de una misma cepa capaz de crecer como levadura y como hifa permite *a priori* el estudio de la filamentación con mayor precisión.

En nuestro grupo se ha caracterizado un modelo de colonización gastrointestinal en ratón con el objetivo de describir el comensalismo así como el curso natural de la infección. En dicho modelo se ha confirmado la capacidad de *C. albicans* de establecerse en el intestino y de mantener una colonización en el tiempo, empleando un tratamiento antibiótico que así lo permita. En este trabajo nos planteamos analizar la contribución de la filamentación durante el curso de una colonización intestinal.

Nuestro grupo también ha contribuido al estudio y caracterización de la respuesta inmunitaria de tipo humoral generada durante el curso de una infección sistémica en modelos de ratón. El desarrollo y optimización en nuestro grupo de un modelo de colonización intestinal nos ha permitido también abordar la respuesta humoral generada durante el curso de dicha colonización por *C. albicans* en nuestro modelo y determinar el papel que la colonización puede tener en la protección frente a una infección fúngica sistémica.



## Resultados

---



## 1. Obtención y caracterización *in vitro* de una cepa de *Candida albicans* de filamentación regulada

### A. Obtención de cepas de *C. albicans* de filamentación regulada -

En este trabajo, nos planteamos el desarrollo de cepas de *C. albicans* en las que la transición levadura hifa pudiera ser controlada mediante factores externos como es la adición de un compuesto químico. Para ello, hemos usado el sistema TET-ON/OFF descrito por el grupo de J. Morschäusser (Park & Morschhauser, 2005) con el objetivo de modular la expresión del gen *TUP1*, un regulador negativo de la transición levadura hifa. Este sistema de regulación por tetraciclina (doxiciclina) ha sido empleado por nuestro grupo en numerosas ocasiones, usando tanto versiones inducibles (TET-ON) como reprimibles (TET-OFF) (Prieto *et al.*, 2014).

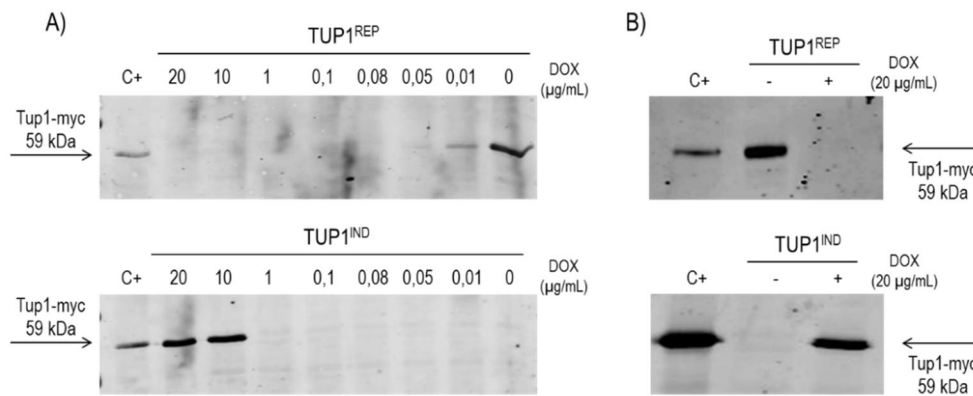
El mutante *tup1* fue obtenido por Braun y Johnson en 1997 (Braun, 1997) y presenta un fenotipo filamentosos constitutivo en numerosas condiciones de crecimiento en el laboratorio. Dado el papel de *TUP1* como regulador negativo de la transición (Braun, Head, *et al.*, 2000) y la identificación de numerosos genes regulados por éste en los años siguientes, nos pareció una elección adecuada para modular la morfología hifal *in vivo*.

La obtención de las construcciones de interés (pNIM1R-URA3-TUP1 como versión reprimible por tetraciclina y pNIM1-URA3-TUP1 como inducible) se detalla en Materiales y Métodos. Ambas construcciones genéticas fueron integradas en el genoma de la cepa *tup1* (Braun, 1997) (Tabla 2, Materiales y Métodos) y la selección se realizó en medio mínimo sin uracilo. Denominamos a las cepas obtenidas TUP1<sup>REP</sup> y TUP1<sup>IND</sup> en función de si la doxiciclina actúa como represor o como inductor de la expresión de *TUP1*, respectivamente. La detección de la expresión de *TUP1* en ambas cepas fue confirmada por *western blot* empleando el anticuerpo Anti-myc, que reconoce el epítipo fusionado al alelo silvestre de *Tup1*. El tamaño de la proteína correspondía con el teórico (59 kDa).

Con el objetivo de verificar el correcto funcionamiento del sistema de regulación por tetraciclina en las cepas TUP1<sup>REP</sup> y TUP1<sup>IND</sup>, ambas fueron incubadas en medio líquido YPD suplementado con concentraciones crecientes de doxiciclina durante 16 horas, tras lo cual se detectó la producción de *Tup1* en cada condición.

La cepa TUP1<sup>REP</sup> produce *Tup1* en condiciones estándar de crecimiento *in vitro*, mientras que la adición de una pequeña concentración de doxiciclina (0,08 µg/mL) reprime la expresión del gen, no detectándose la proteína mediante anticuerpos. Sin embargo, en la cepa TUP1<sup>IND</sup> sólo se produce *Tup1* a concentraciones mayores de 10 µg/mL (Figura 7A). Esta diferencia de comportamiento indica una diferente sensibilidad entre ambos sistemas de regulación debida, probablemente, a la naturaleza de las mutaciones presentes en el transactivador tTA.



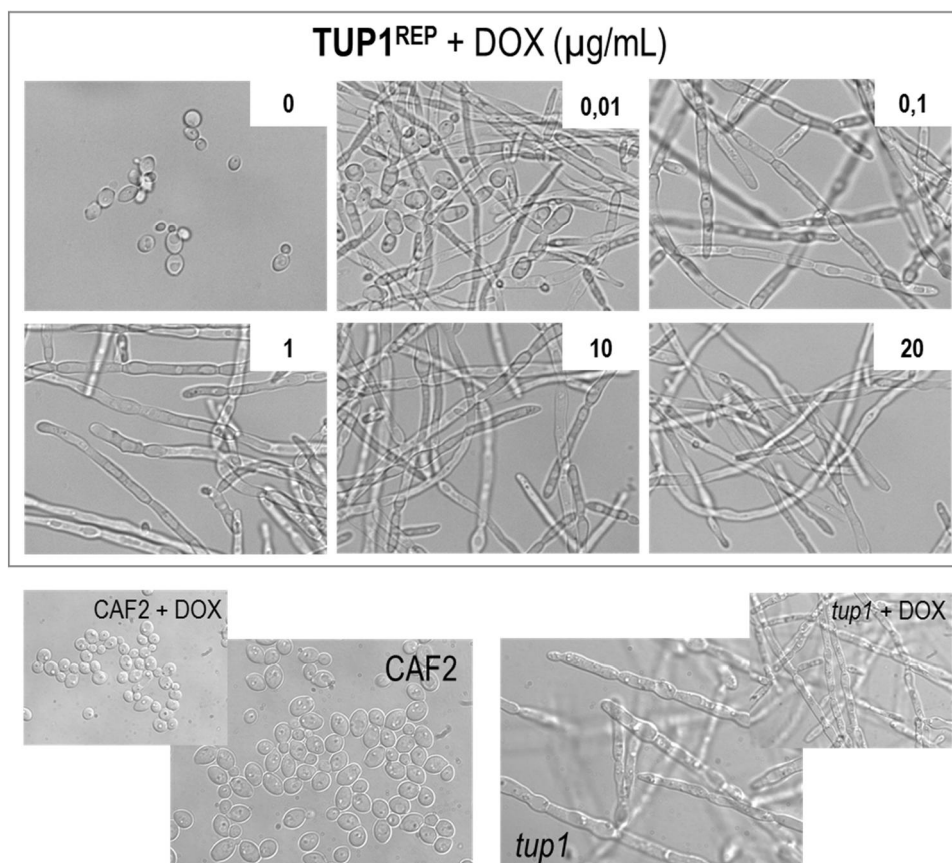


**Figura 7. Regulación de la expresión de *TUP1* con el sistema TET-ON/OFF en las cepas TUP1<sup>REP</sup> y TUP1<sup>IND</sup>**

Imunodetección en SDS-PAGE de Tup1-myc. A) Producción de Tup1 en presencia de concentraciones decrecientes de doxíciclina en la cepa TUP1<sup>REP</sup> (arriba) y TUP1<sup>IND</sup> (abajo). En todos los casos los extractos proteicos de cada cepa fueron obtenidos tras un crecimiento de 16 horas y a 37 °C en medio YPD con la concentración correspondiente de doxíciclina. B) Producción de Tup1-myc en las cepas TUP1<sup>REP</sup> y TUP1<sup>IND</sup>, tras un crecimiento en medio YPD con y sin 20 µg/mL durante 16 horas a 37 °C. El control positivo (C+) corresponde a un extracto con la proteína Tup1-myc obtenido en un ensayo independiente.

Seleccionamos 20 µg/mL de doxíciclina como dosis estándar de encendido vs. apagado del sistema, puesto que esta concentración bloquea por completo la expresión de *TUP1* en la cepa reprimible TUP1<sup>REP</sup> e induce totalmente la expresión de *TUP1* en la versión inducible TUP1<sup>IND</sup> (Figura 7B).

Con objeto de relacionar en estos mutantes condicionales la expresión de *TUP1* con la morfología celular, se determinó la morfología presentada por ambas cepas, en ausencia de doxíciclina y en concentraciones crecientes de la misma durante 16 horas. Como se aprecia en la Figura 8, la cepa reprimible TUP1<sup>REP</sup> crece constitutivamente en forma levaduriforme mientras que la presencia de concentraciones crecientes del antibiótico bloquean permite la formación de la forma hifal.



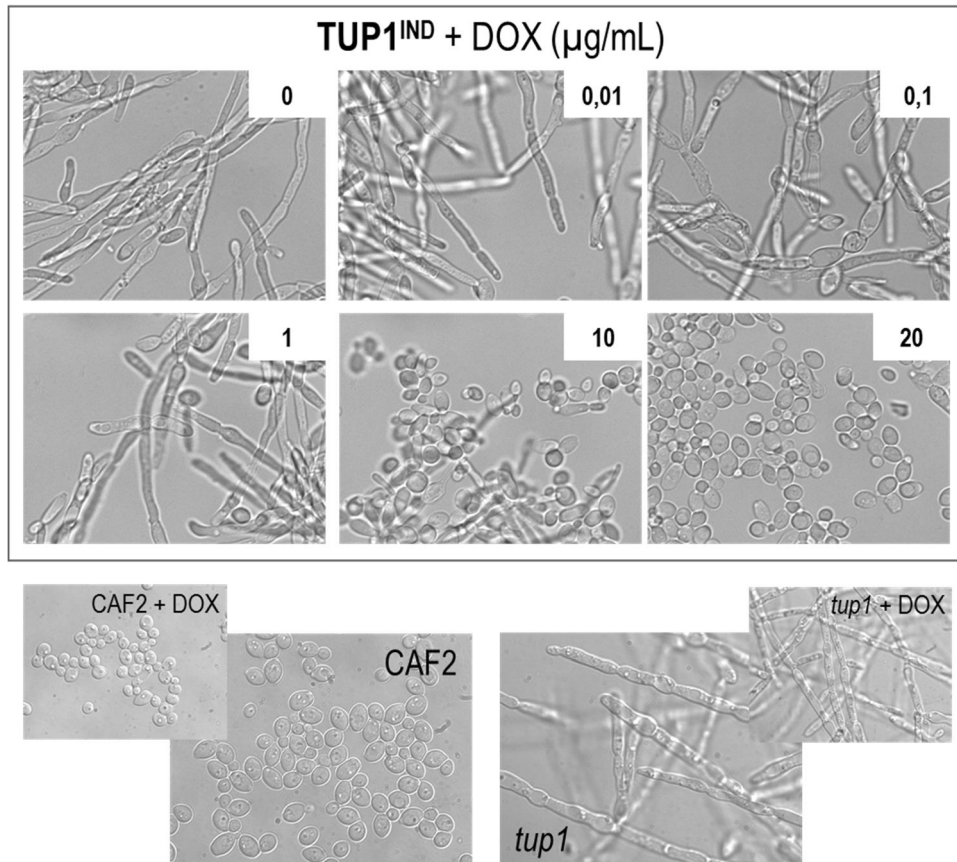
**Figura 8. Morfología de la cepa TUP1<sup>REP</sup> en presencia de doxiciclina**

Morfología celular de la cepa TUP1<sup>REP</sup> a diferentes concentraciones de doxiciclina en µg/mL (indicadas sobre cada imagen). Las imágenes fueron tomadas tras 16 horas de incubación en medio YPD con la concentración de antibiótico correspondiente y a 37 °C. En el panel de abajo se muestran las respectivas morfologías de la cepa CAF2 (silvestre) y del mutante homocigoto *tup1* en presencia de doxiciclina a 20 µg/mL.

En presencia de la menor concentración de doxiciclina (0,01 µg/mL), la cepa TUP1<sup>REP</sup> eran apreciables tanto la forma levaduriforme como hifal (Figura 8). La mayor sensibilidad del sistema reprimible se observa de nuevo en la morfología celular, ya que una concentración de 0,1 µg/mL del antibiótico es suficiente para inducir mayoritariamente el crecimiento filamentoso.

La cepa inducible TUP1<sup>IND</sup> crece constitutivamente en forma filamentosa y la presencia de concentraciones crecientes del antibiótico induce la expresión de TUP1 (Figura 6), lo que se traduce en un aumento del crecimiento levaduriforme (Figura 9). Tal y como hemos comentado, la sensibilidad del sistema inducible es menor, por lo que el crecimiento levaduriforme solo se detectó a la concentración de doxiciclina máxima (20 µg/mL). En esta versión, utilizando bajas concentraciones del antibiótico, la cepa es incapaz de crecer como levadura y muestra un fenotipo filamentoso. Finalmente, el crecimiento en

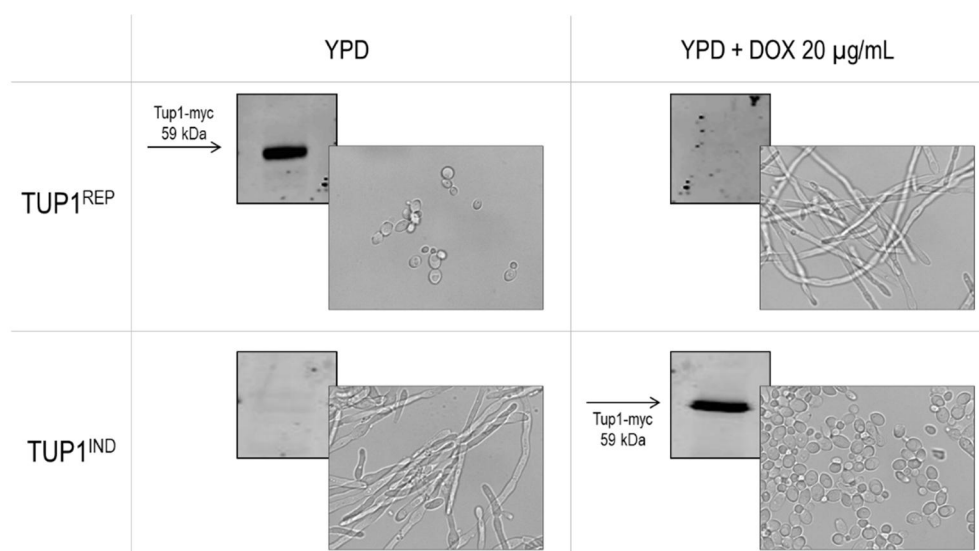
concentraciones altas del antibiótico (10  $\mu\text{g/mL}$ ) no es suficiente para inducir la expresión de *TUP1* lo que se traduce en la presencia de ambas morfologías (Figura 9).



**Figura 9. Morfología de la cepa TUP1<sup>IND</sup> en presencia de doxiciclina**

Morfología celular de la cepa TUP1<sup>IND</sup> creciendo en diferentes concentraciones de doxiciclina. Dichas concentraciones se indican en  $\mu\text{g/mL}$  indicadas en cada imagen. De la misma forma que con la cepa TUP1<sup>REP</sup>, estas imágenes fueron tomadas tras 16 horas de incubación a 37°C creciendo en medio YPD suplementado con la concentración de antibiótico indicada. En el panel inferior se muestran las morfologías de la cepa CAF2 y del mutante homocigoto *tup1*, no afectadas por la presencia de doxiciclina a 20  $\mu\text{g/mL}$ .

En conclusión, estos análisis reflejan que los vectores desarrollados y las cepas generadas a partir de ellos son un mecanismo eficiente para controlar la morfología celular vía la expresión del regulador Tup1.



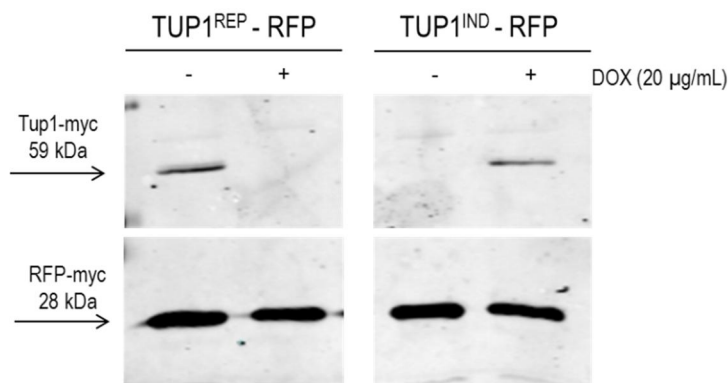
**Figura 10. Regulación de la expresión de *TUP1* y de la morfología celular en las cepas *TUP1*<sup>REP</sup> y *TUP1*<sup>IND</sup>**

Se muestra la morfología celular presentada por las cepas *TUP1*<sup>REP</sup> y *TUP1*<sup>IND</sup> tras ser incubadas en medio líquido YPD suplementado (o no suplementado) con doxiciclina a 20 µg/mL durante 16 horas a 37 °C. Junto a cada imagen se muestra la detección mediante *western blot* de Tup1 producido por cada cepa en las mismas condiciones.

#### a) Marcaje fluorescente de las cepas de filamentación controlada

La expresión de proteínas fluorescentes ha sido utilizada ampliamente por numerosos grupos de investigación por su utilidad en la detección de diferentes sistemas biológicos. En nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* gracias al marcaje fluorescente de determinadas cepas de *C. albicans* (Prieto *et al.*, 2014). Dado el potencial de esta técnica, marcamos los mutantes condicionales descritos anteriormente (*TUP1*<sup>REP</sup> y *TUP1*<sup>IND</sup>) con la proteína RFP (*Red Fluorescent Protein*) procedente de coral (DsRed) (Matz *et al.*, 1999) y posteriormente adaptada a *C. albicans* (dTomato) (Shaner *et al.*, 2004). Para ello, se integró en ambas cepas una construcción que porta la secuencia de la proteína roja RFP fusionada al epítipo myc, bajo el control del promotor de actina (*ACT1*). Estas construcciones portan el marcador *SAT1* que confiere resistencia a nourseotricina (ver Materiales y Métodos).

En las nuevas cepas obtenidas *TUP1*<sup>REP</sup>-RFP y *TUP1*<sup>IND</sup>-RFP se detectaron los mismos niveles de proteína fluorescente RFP, tal como se refleja en la Figura 11, ya que dicha expresión es constitutiva debido a que se encuentra bajo el control del promotor de actina. Por otra parte, la presencia de doxiciclina modula eficazmente la expresión condicional de *TUP1*, independientemente del marcaje fluorescente.

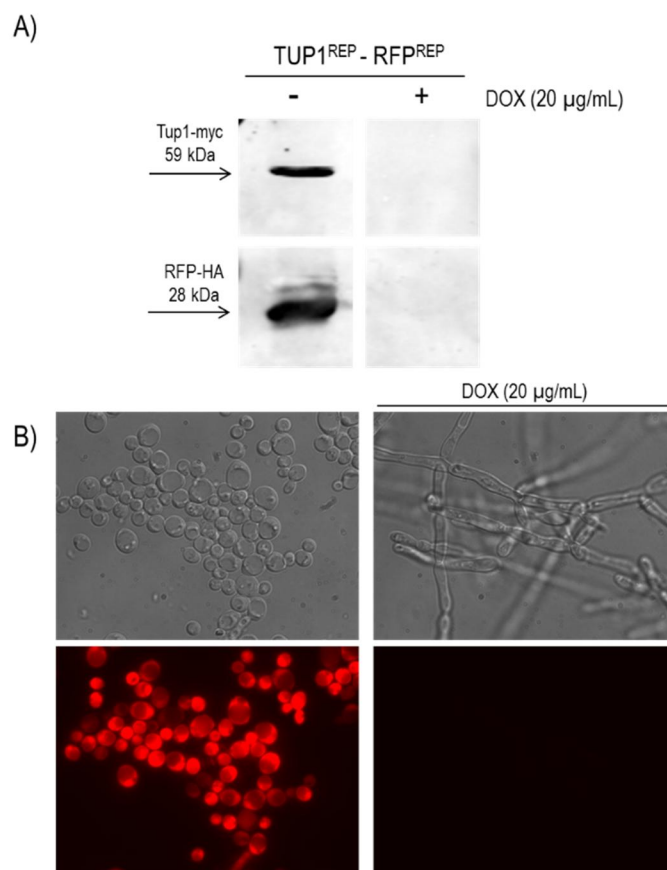


**Figura 11. Detección de la expresión de RFP-myc en las cepas TUP1<sup>REP</sup>-RFP y TUP1<sup>IND</sup>-RFP**

Inmunodetección de Tup1 y de la proteína fluorescente roja (RFP) en las cepas TUP1<sup>REP</sup>-RFP y TUP1<sup>IND</sup>-RFP crecidas en presencia y ausencia de doxiciclina (20 µg/mL). Los cultivos de ambas cepas fueron incubados en medio YPD con y sin el antibiótico a 37 °C durante 16 horas antes de obtener los extractos proteicos. La detección de ambas proteínas se realizó mediante *western blot* empleando el anticuerpo Anti-myc.

Desarrollamos igualmente una versión de la cepa TUP1<sup>REP</sup> en el que la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP) estuviera regulada por el sistema *tet* en su versión reprimible. En este caso, dicho marcaje se llevó a cabo integrando en su genoma una construcción genética que porta la proteína RFP fusionada al epítipo HA bajo el control del sistema de regulación TET (ver Materiales y Métodos).

La nueva cepa condicional obtenida (TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>) expresaba tanto *TUP1* como RFP en condiciones estándar, mientras que la producción de ambas proteínas era reprimida en presencia de doxiciclina en el medio (Figura 12A). La regulación en la expresión de ambos genes se reflejó en la morfología celular así como en la expresión de fluorescencia. Así, la expresión de Tup1 y RFP da lugar a una morfología levaduriforme en la que se observa fluorescencia roja, mientras que la represión de ambas proteínas por doxiciclina se traduce en un fenotipo filamentoso y ausencia de fluorescencia (Figura 12B).



**Figura 12. Marcaje con RFP<sup>REP</sup> de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>**

A) Detección mediante *western blot* de las proteínas Tup1-myc y RFP-HA (con los anticuerpos Anti-myc y Anti-HA respectivamente) expresadas por la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia y ausencia de doxiciclina (20 µg/mL). B) Morfología celular de la cepa en función de la adición de doxiciclina (panel de arriba) y expresión de la RFP reprimida por el antibiótico (panel de abajo), vista en el microscopio de fluorescencia. Tanto los extractos proteicos como las imágenes fueron tomados tras 16 horas de crecimiento en medio YPD y a 37 °C.

Como vemos en la figura, disponemos en este punto de una cepa de *C. albicans* en la que tanto la expresión de *TUP1* como la de RFP son regulables de manera externa mediante la adición de doxiciclina. Este doble mutante condicional TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> es la cepa que a lo largo de esta tesis doctoral será caracterizada en mayor profundidad.

#### b) Regulación por doxiciclina vs. clortetraciclina autoclavada (aCT)

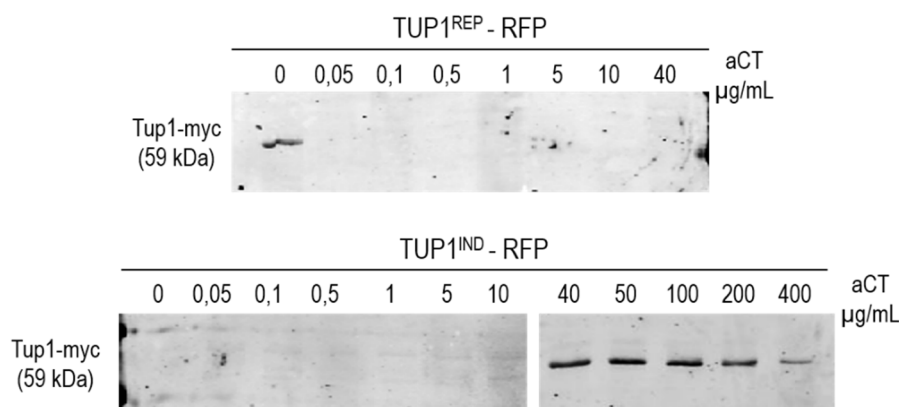
El sistema de regulación por tetraciclina utilizado en este trabajo y tal y como hemos comprobado anteriormente, es altamente eficaz para la modulación de la expresión génica en *C. albicans*. Sin embargo, tiene el inconveniente de que la doxiciclina es un antibacteriano de amplio espectro que puede limitar de forma importante el diseño experimental en aquellos estudios en los que el hongo se encuentre interaccionando la microbiota endógena, complicando por ello su interpretación. Por este motivo, nos



planteamos la utilización de una variante inactiva, en buena medida, por tratamiento térmico intenso (clortetraciclina autoclavada) (ver Materiales y Métodos). En una primera etapa estudiamos la adecuación de este derivado en experimentos de regulación expresión génica.

En primer lugar se comparó la actividad antimicrobiana (medida mediante la determinación de su CMI) tanto de la doxiciclina y como de la clortetraciclina autoclavada (aCT), utilizando la cepa control DH5 $\alpha$  de *E. coli*. La aCT mostró una CMI de 50  $\mu\text{g/mL}$ , frente a los 1,5  $\mu\text{g/mL}$  correspondientes a la doxiciclina, lo que supone una disminución de la actividad antimicrobiana de aproximadamente 30 veces.

Determinamos la capacidad de la aCT de regular la expresión de *TUP1* en las cepas anteriormente descritas TUP1<sup>REP</sup>-RFP y TUP1<sup>IND</sup>-RFP. Como se muestra en la Figura 13, en la cepa TUP1<sup>IND</sup>-RFP la concentración mínima de antibiótico necesaria para la expresión de *TUP1* fue 4 veces mayor que la requerida por doxiciclina (40 frente a 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Sin embargo, en la cepa reprimible (TUP1<sup>REP</sup>-RFP) la eficiencia de la aCT fue prácticamente similar, siendo suficiente una concentración de 0,05  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 13).



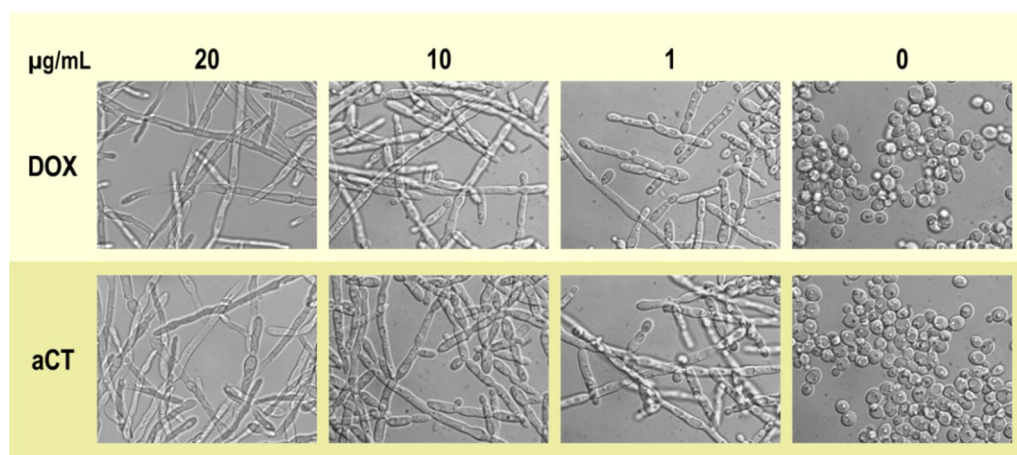
**Figura 13. Represión e inducción de *TUP1* en presencia de aCT**

Detección de Tup1-myc en las cepas TUP1<sup>REP</sup>-RFP y TUP1<sup>IND</sup>-RFP crecidas en presencia de concentraciones crecientes de aCT (indicadas en  $\mu\text{g/mL}$ ). La obtención de extractos proteicos se realizó tras 16 horas de crecimiento en medio líquido YPD suplementado con las concentraciones de aCT indicadas y a 37 °C.

Estos resultados nos confirman de nuevo la significativa diferencia entre la sensibilidad de ambos sistemas de regulación frente al antibiótico. El sistema inducible requiere una dosis de aCT de 40  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el reprimible funciona de manera eficaz a la mínima concentración analizada de aCT (0,05  $\mu\text{g/mL}$ ), presentando en este caso la misma eficiencia que la doxiciclina (Figura 7).

A continuación, comprobamos si dicha regulación y, de forma similar a lo detectado previamente (Figuras 8 y 9), también se reflejaba en la morfología celular. La aCT muestra una capacidad similar a la doxiciclina en la regulación de la expresión génica, y por tanto,

en la modulación de la morfología celular, tal y como se muestra en la Figura 14. La inducción de la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> es prácticamente idéntica, tanto en presencia de concentraciones crecientes de doxiciclina como de aCT.

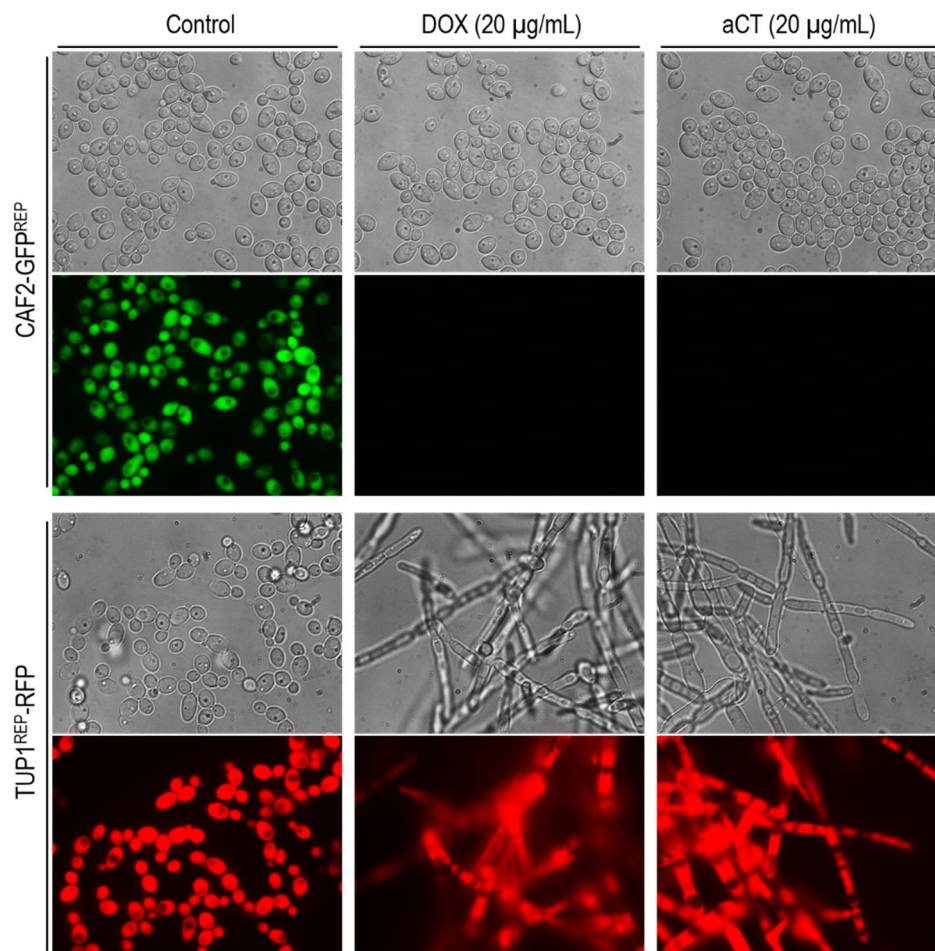


**Figura 14. Morfología de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de doxiciclina y aCT**

Se muestra la morfología presentada por la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> tras su crecimiento en presencia de las concentraciones indicadas en μg/mL (20, 10, 1 y 0) de doxiciclina y de aCT. La cepa fue incubada en medio YPD suplementado o no con los antibióticos durante 16 horas y a 37 °C antes de tomar las imágenes.

Por último, y para conocer la versatilidad del sistema, utilizamos una cepa silvestre CAF2 marcada con la proteína fluorescente verde regulada por el mismo promotor de tetraciclina (versión reprimible) comprobando una vez más la misma capacidad reguladora de la aCT, comparada con la doxiciclina. En esta cepa (CAF2-GFP<sup>REP</sup>) la represión de dicha fluorescencia es provocada indistintamente por la presencia de ambos compuestos (Figura 15). La fluorescencia roja, sin embargo y como se aprecia en la figura, se observa en todas las condiciones estudiadas, ya que su expresión es constitutiva.





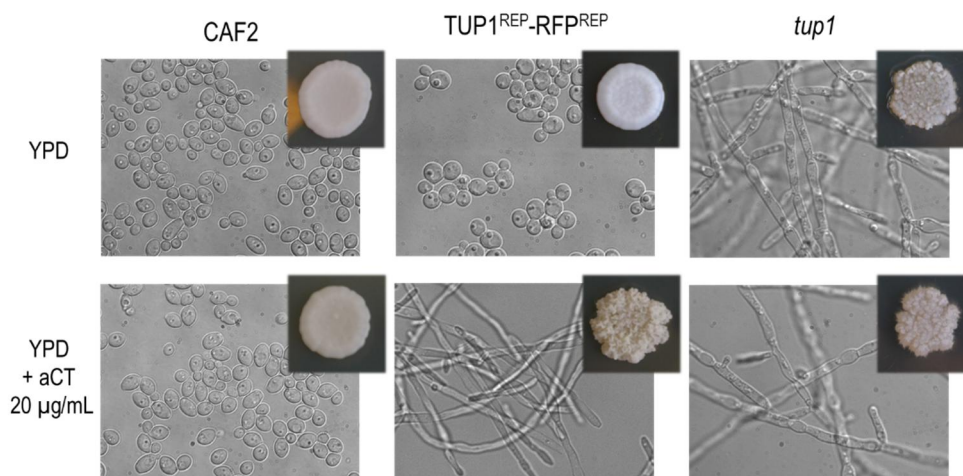
**Figura 15. Efectos de la aCT y la doxyciclina en la represión del promotor TET**

Regulación de la expresión de GFP y *TUP1* por doxyciclina y aCT en las cepas CAF2-GFP<sup>REP</sup> y TUP1<sup>REP</sup>-RFP. Las dos cepas fueron incubadas en medio líquido YPD suplementado o no con cada antibiótico, a 37 °C y durante 16 horas antes de tomar las imágenes.

Estos resultados nos confirman que tanto la aCT como la doxyciclina son igualmente válidas para la regulación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. Ambos compuestos funcionan eficientemente a 20 µg/mL reprimiendo la expresión de *TUP1* y RFP y regulando así la filamentación. Seleccionamos, como ya hicimos con la doxyciclina, la concentración de 20 µg/mL de aCT como dosis estándar para el encendido y apagado del sistema de regulación.

Por último y dada la relación directa entre la morfología celular y la colonial, tal y como lo indican los abundantes datos en la bibliografía (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Braun & Johnson, 2000; Braun *et al.*, 2001), nos planteamos comprobar dicha correlación utilizando el mutante condicional. Como se aprecia en la Figura 16, el mutante TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> es levaduriforme en condiciones estándar, lo que se refleja en colonias lisas y de aspecto cremoso, similares a las generadas por la cepa silvestre CAF2. La adición de 20 µg/mL de aCT en el medio induce la filamentación del mutante condicional así como

colonias de aspecto rugoso y con bordes irregulares, similares a las del mutante de origen *tup1*. Verificamos una vez más la especificidad del sistema regulado por aCT ya que utilizando cepas controles (CAF2 y *tup1*) el antibiótico no altera ni el crecimiento ni la morfología de *C. albicans*.

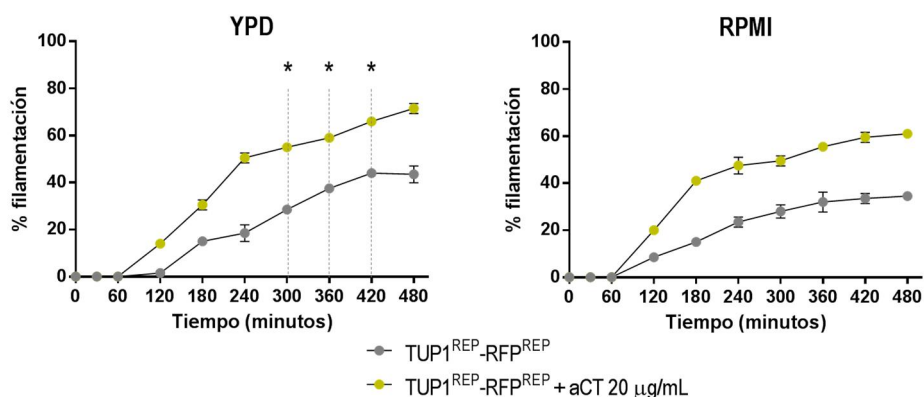


**Figura 16. Morfología colonial de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>**

Morfología de las cepas CAF2, TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> y el mutante homocigoto *tup1* tras un crecimiento en medio líquido YPD (con y sin aCT a 20 µg/mL) durante 16 horas y a 37 °C. Junto a cada figura se muestra el aspecto colonial de cada cepa en medio YPD sólido con y sin la misma dosis del antibiótico. Las cepas indicadas crecieron en medio sólido durante 48 horas y a 37 °C.

Por último, nos planteamos cuantificar el grado de filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> inducida por la presencia de aCT a lo largo del tiempo (durante 8 horas) utilizando medios líquidos ricos como el YPD y el RPMI.

El mutante en presencia de medios ricos filamentaba a lo largo del tiempo de forma similar en ambos medios, tal y como se refleja en la Figura 16; tras 8 horas de crecimiento, mostró un porcentaje de filamentación de un 40 % en medio YPD y un 30 % en medio RPMI. La adición de aCT incrementó de forma equivalente el porcentaje de hifas en ambos medios, alcanzando al final del ensayo un nivel de filamentación de un  $70 \pm 3,9$  % en medio YPD y un  $60 \pm 3,7$  % en medio RPMI (Figura 17).



**Figura 17. Cuantificación de la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en medio líquido**

Porcentajes de filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> creciendo en medio líquido YPD y RPMI con y sin aCT a 20 µg/mL. La cepa fue incubada previamente en medio líquido YPD durante 16 horas y a 37 °C. Posteriormente las células fueron lavadas e inoculadas en los medios de cultivo correspondientes a una densidad óptica de 0,01. Los porcentajes fueron calculados mediante el recuento de hifas y levaduras en dos campos homogéneos de cada muestra y en los tiempos indicados. \*p<0,05

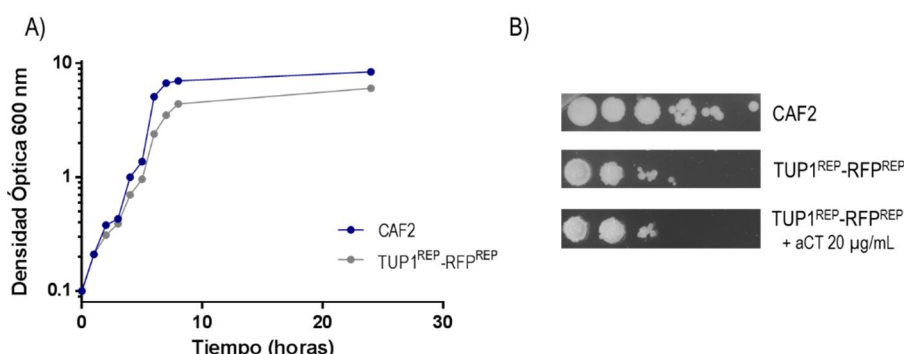
Al cuantificar la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a lo largo del tiempo observamos que, en todas las condiciones y medios ensayados, la aparición de la filamentación se inicia tras los primeros 60 minutos de crecimiento. Al cabo de 120 minutos, la cantidad de hifas en medio YPD es muy baja (2 %), mientras que la adición de aCT hace que este valor se eleve hasta un 15 % aproximadamente. En este mismo punto y en medio RPMI, los porcentajes de hifas oscilan el 10 %, si bien este valor prácticamente se duplica en presencia de aCT.

En conclusión, hemos caracterizado el mutante de filamentación controlada TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> y verificado la utilidad tanto de la doxiciclina como de la aCT a efectos de su uso en la regulación de la morfología de la cepa. A lo largo del presente trabajo se utilizarán ambos antibióticos indistintamente dependiendo de la finalidad de los experimentos.

## B. Caracterización *in vitro* de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>

Como primera aproximación en la caracterización *in vitro* de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, estudiamos su crecimiento, tanto en medio líquido como sólido (Figura 18). En primer lugar realizamos una curva estándar de crecimiento en medio líquido. El mutante condicional presentó un tiempo de generación de 110 minutos, ligeramente mayor que el mostrado por la cepa silvestre CAF2 (89 minutos). El crecimiento en medio sólido de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> comparado con la silvestre CAF2 es ligeramente inferior, tal y como se observa en la Figura 18b. Por otra parte, la presencia de aCT en el medio, no altera el crecimiento de la cepa, aunque favorece la aparición de colonias rugosas

similares a las descritas anteriormente (Figura 16) que reflejan la inducción de la filamentación.



**Figura 18. Crecimiento de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en medio YPD**

Valores de densidad óptica medida a 600 nm y en distintos puntos en el tiempo de las cepas CAF2 (silvestre) y TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. Ambas cepas fueron incubadas previamente durante 16 horas en medio líquido YPD a 37 °C y posteriormente reinoculadas en el mismo medio a una densidad óptica inicial de 0,01. Junto a la gráfica se muestra el crecimiento en gota por diluciones seriadas 1/10 de ambas cepas en medio sólido YPD durante 48 horas a 37°C.

#### a) Sensibilidad a distintas condiciones y agentes externos

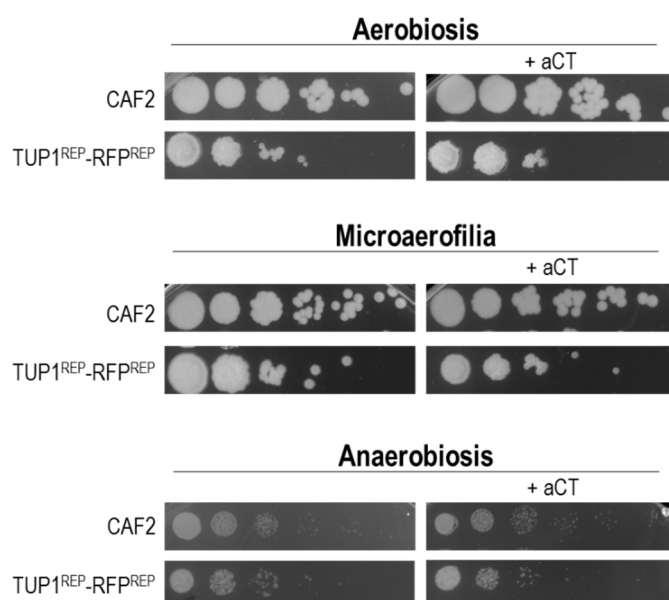
Con intención de determinar la influencia de determinados factores físico-químicos en el crecimiento de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en función de su morfología, controlada por la aCT, se realizaron ensayos de sensibilidad frente a compuestos o condiciones que alterasen de algún modo el crecimiento del hongo. Todos los experimentos fueron realizados en medios sólidos y en presencia y ausencia de aCT a 20 µg/mL.

En primer lugar quisimos saber si el crecimiento de la cepa de filamentación regulada es similar en presencia de diferentes fuentes de carbono. El crecimiento de la cepa en presencia de glucosa (medio YPD), galactosa (YPG) y etanol (YPEtOH) resultó ser similar, tanto en presencia como en ausencia de aCT (datos no mostrados).

##### a.1. Condiciones limitantes de oxígeno

La presencia de oxígeno en el medio es uno de los factores ambientales limitantes del crecimiento de muchos microorganismos. *C. albicans* crece tanto en condiciones aerobias como en distintos grados de hipoxia, explicando su adaptabilidad a las diferentes condiciones del hospedador. Se ha descrito la relación entre bajas concentraciones de oxígeno en el medio y un incremento en la filamentación del hongo (Biswas *et al.*, 2007; Doedt *et al.*, 2004; Mulhern *et al.*, 2006). Por ello, se analizó la influencia de la filamentación en el crecimiento de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en distintas condiciones de disponibilidad de oxígeno y en medio sólido: aerobiosis, microaerofilia y anaerobiosis estricta.

La cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> no mostró sensibilidad frente a ninguna de las condiciones analizadas; su crecimiento en microaerofilia es similar al mostrado en condiciones estándar y ligeramente menor en ausencia de oxígeno. La presencia de aCT indujo la formación de colonias de aspecto filamentosas, pero no afectó al crecimiento de la cepa en ninguno de los casos (Figura 19).



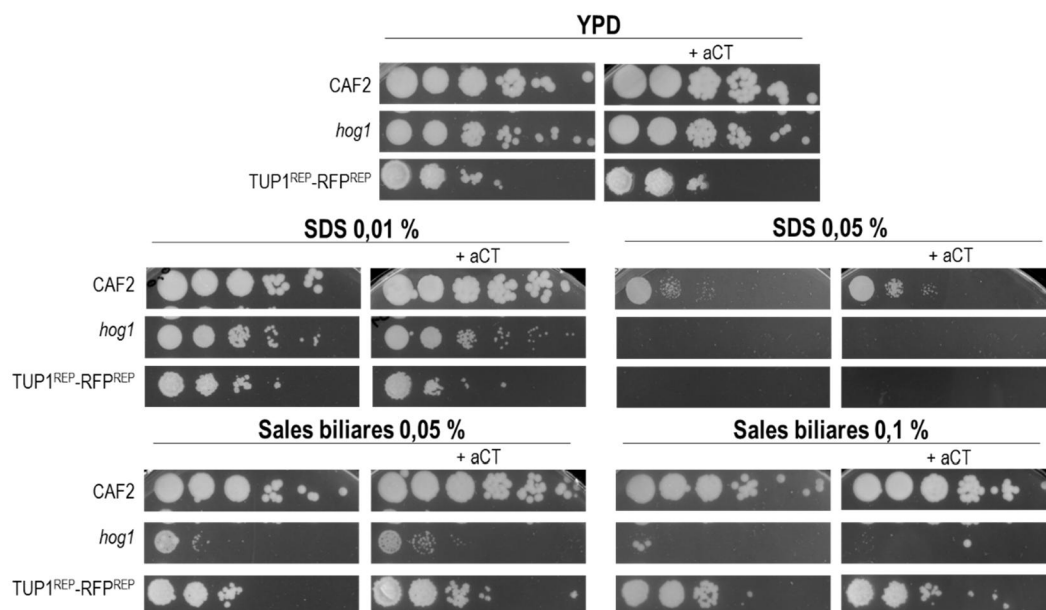
**Figura 19. Crecimiento en condiciones limitantes de oxígeno**

Ensayo de crecimiento en gota por diluciones seriadas 1/10 de las cepas indicadas en microaerofilia y en anaerobiosis con y sin aCT a 20 µg/mL. Las células fueron previamente incubadas en medio YPD y a 37°C durante 16 horas. Una vez depositadas en la placa, éstas fueron incubadas durante 48 horas a la misma temperatura.

## a.2. Sensibilidad a sales biliares

La resistencia a sales biliares parece *a priori* un factor importante que pudiera condicionar el establecimiento de *C. albicans* en el tracto gastrointestinal. Por ello, se analizó el crecimiento de la cepa condicional en presencia tanto de sales biliares como de SDS, compuesto de similares efectos emulgentes. En estos ensayos se utilizó como control el mutante *hog1*, para el que hemos descrito recientemente su mayor sensibilidad a estos compuestos (Prieto *et al.*, 2014).

La cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> no mostró sensibilidad a las concentraciones ensayadas de sales biliares (0,05 y 0,1 %), y este comportamiento no se vio afectado por la presencia de aCT en el medio de cultivo (datos no mostrados). Sin embargo, es ligeramente más sensible que la cepa parental en presencia de SDS al 0,05 %, comportamiento que comparte con el mutante *hog1* (Figura 20).



**Figura 20. Sensibilidad de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a sales biliares y SDS**

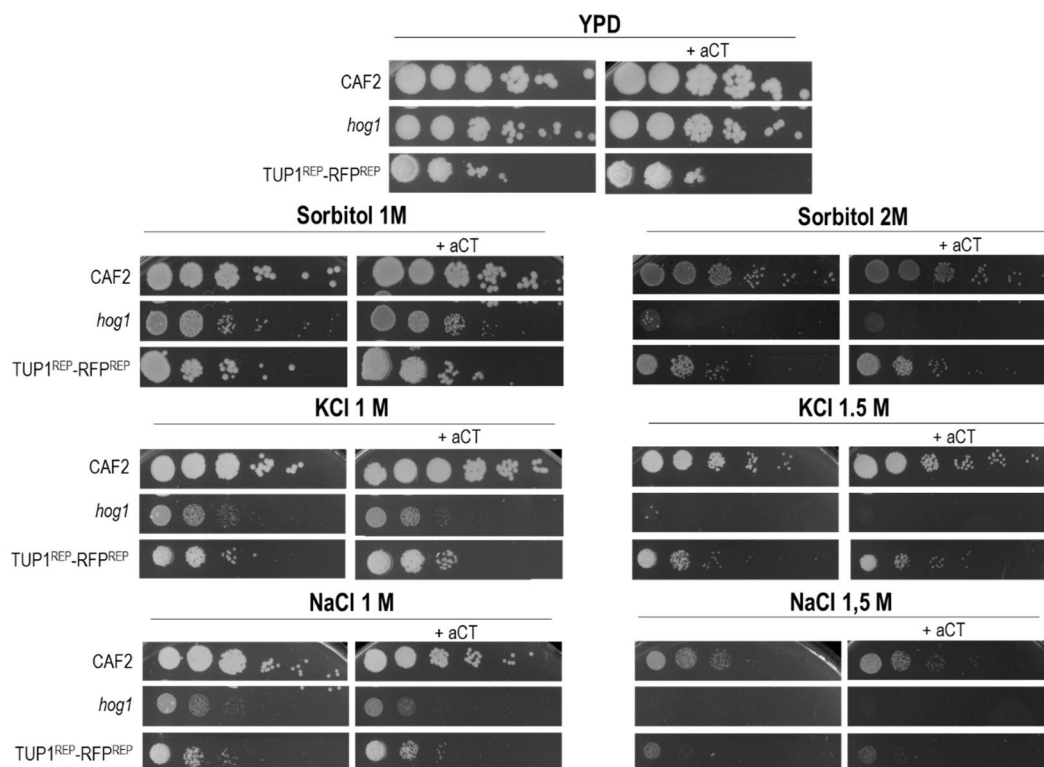
Ensayo de crecimiento en placa mediante diluciones seriadas 1/10 de las cepas indicadas en presencia de sales biliares y SDS en presencia o ausencia de aCT (20 µg/mL). Las células fueron previamente incubadas en medio YPD y a 37 °C durante 16 horas; una vez depositadas en la placa, éstas fueron incubadas durante 48 horas a la misma temperatura antes de fotografiarse.

### a.3. Sensibilidad a estrés osmótico

Para determinar si la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> mostraba sensibilidad a agentes capaces de producir estrés osmótico en el hongo, como son el KCl, el NaCl y el sorbitol, cultivamos dicho microorganismo en presencia de estos compuestos en medio sólido. Como control de sensibilidad empleamos el mutante *hog1* (Alonso-Monge *et al.*, 2003).

La cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> no presentó sensibilidad frente a las concentraciones analizadas de sorbitol (1 y 2 M) y de KCl (1 y 1,5 M). La adición de aCT tampoco alteró el crecimiento de la cepa en estas condiciones. En presencia de NaCl a una concentración de 1,5 M se observó un menor crecimiento. Este comportamiento fue, de nuevo, independiente de la presencia de Tup1 (Figura 21).





**Figura 21. Sensibilidad a estrés osmótico de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>**

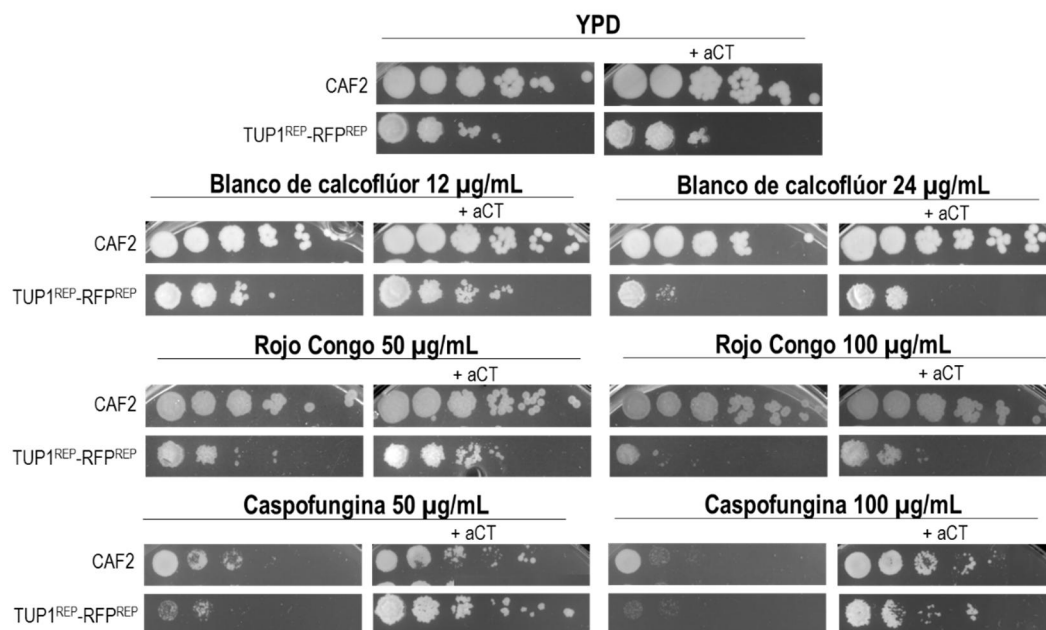
Ensayo de crecimiento en gota por diluciones seriadas 1/10 de las cepas indicadas en presencia de agentes causantes de estrés osmótico (NaCl, KCl y sorbitol) con y sin aCT a 20 µg/mL. Las células fueron previamente incubadas en medio YPD y a 37 °C durante 16 horas. Una vez depositadas en la placa, éstas fueron incubadas durante 48 horas a la misma temperatura.

#### a.4. Sensibilidad a agentes que alteran la pared celular

Durante la filamentación, la composición de la pared celular cambia, y dichos cambios tienen implicaciones en ocasiones una mayor sensibilidad frente a compuestos que intervienen en el ensamblaje de la pared. Por ello nos planteamos conocer el comportamiento de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de agentes como el blanco de calcoflúor (que interfiere en el ensamblaje de las moléculas de quitina), el rojo Congo (que interviene en el correcto ensamblaje de la pared celular) o la caspofungina (equinocandina que inhibe la síntesis del  $\beta$ -(1,3)-glucano).

Pudimos observar en primer lugar que el crecimiento de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de las concentraciones ensayadas de blanco de calcoflúor (12 y 24 µg/mL) y de rojo Congo (50 y 100 µg/mL) era ligeramente inferior. Sin embargo, la adición de aCT en estas condiciones mejoraba el crecimiento de la cepa. El crecimiento en medio suplementado con caspofungina (50 y 100 µg/mL) evidenció una mayor sensibilidad a dicho antifúngico que la cepa control. Es interesante que la inducción de la filamentación

mediada por aCT suprimía en gran medida la sensibilidad de esta cepa aunque también mejoraba el crecimiento de la cepa silvestre CAF2 (Figura 22).



**Figura 22. Sensibilidad de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a compuestos que alteran la composición de la pared celular**

Ensayo de crecimiento en gota por diluciones seriadas 1/10 de las cepas indicadas en presencia de agentes que dañan la pared celular (blanco de calcoflúor, rojo Congo y caspofungina) con y sin aCT a 20 µg/mL. Las células fueron previamente incubadas en medio YPD y a 37 °C durante 16 horas. Una vez depositadas en la placa, éstas fueron incubadas durante 48 horas a la misma temperatura.

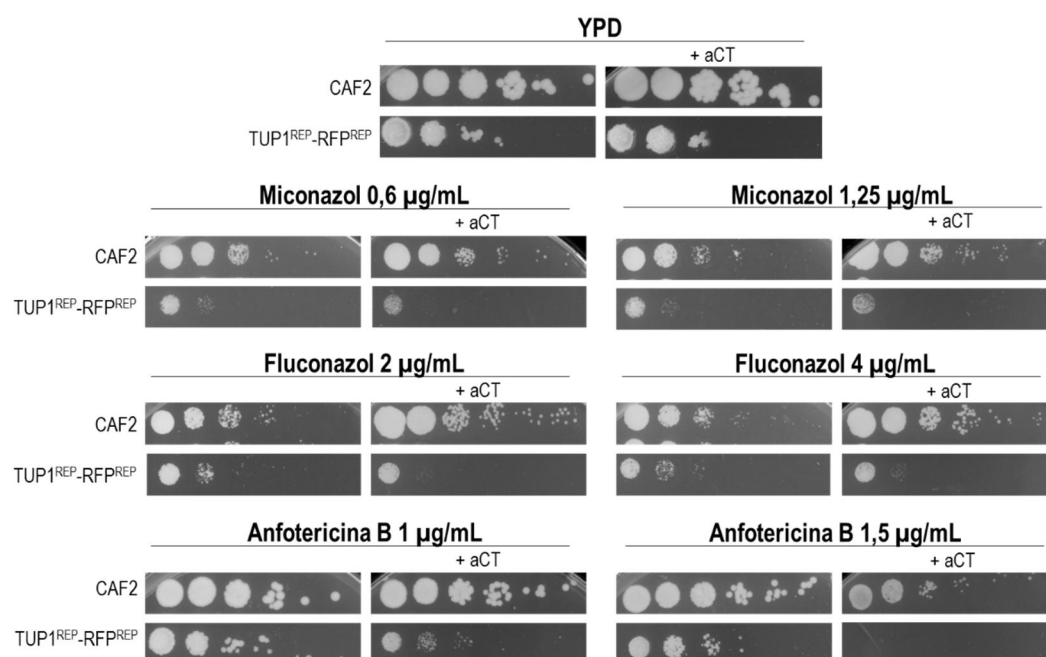
Estos resultados reflejan los cambios que sufre la pared celular de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> durante su filamentación en presencia de aCT. La forma levaduriforme de la cepa presenta cierta sensibilidad a los agentes empleados, mientras que la forma filamentosa parece ser más resistente a la acción de rojo Congo y de blanco de calcoflúor. En el caso de la caspofungina, el hecho de que la adición de aCT reduzca la sensibilidad de la cepa silvestre CAF2 descarta la posibilidad de que la mejora del crecimiento del mutante se deba directamente a su filamentación.

#### **a.5. Sensibilidad a antifúngicos que afectan a la membrana celular**

Algunos antifúngicos como el grupo de los azoles actúan afectando a la funcionalidad de la membrana de *C. albicans*. Estos derivados azólicos actúan principalmente como fungistáticos, impidiendo la síntesis de ergosterol, componente fundamental de la membrana fúngica, a través de la interacción con el complejo enzimático del sistema citocromo p450. La anfotericina B es un poliénico de tipo fungicida que actúa alterando la permeabilidad de la membrana plasmática uniéndose selectivamente al ergosterol (Baginski *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2012).



Se analizó la sensibilidad de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de distintas concentraciones de miconazol, fluconazol y anfotericina B. Como se puede ver en la Figura 23, el crecimiento de la cepa en las condiciones ensayadas era ligeramente menor. La adición de aCT al medio incrementó ligeramente esta sensibilidad en presencia de miconazol y de fluconazol. En el caso de la anfotericina B, el crecimiento de la cepa mutante se inhibió por completo en presencia de aCT. Sin embargo, de nuevo observamos una ligera reducción en el crecimiento de la cepa CAF2 en medio con anfotericina B y aCT, lo que podría deberse a un efecto sinérgico entre ellos.



**Figura 23. Sensibilidad de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a antifúngicos que alteran la membrana celular**

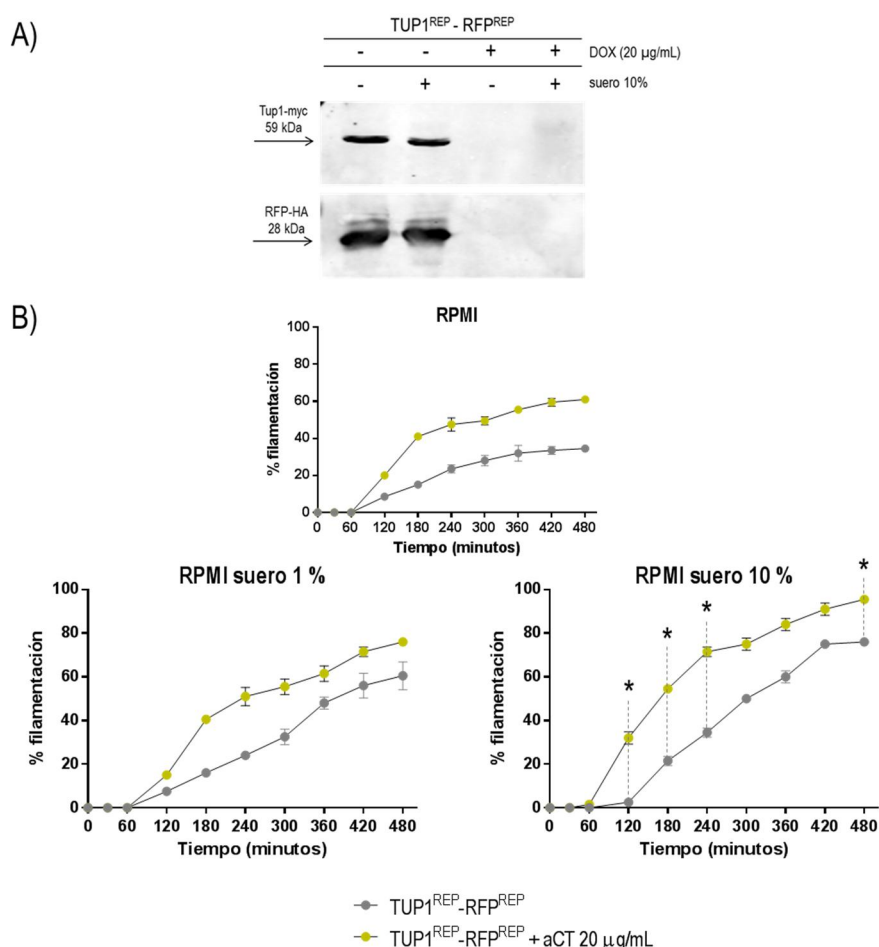
Ensayo de crecimiento en gota por diluciones seriadas 1/10 de las cepas indicadas en medio sólido YPD suplementado con las concentraciones indicadas de miconazol, fluconazol y anfotericina B y en presencia o no de aCT a 20 µg/mL. Las células fueron previamente incubadas en medio YPD y a 37 °C durante 16 horas. Una vez depositadas en la placa, éstas fueron incubadas durante 48 horas a la misma temperatura.

#### b) Influencia del suero en la filamentación

Dada la importancia de *TUP1* en la transición dimórfica de *C. albicans*, quisimos comprobar si la presencia en el medio de suero, uno de los principales inductores de la filamentación del hongo, afectaba de algún modo a los niveles de Tup1 producidos por esta cepa y si el sistema de regulación se veía de alguna forma afectado por la presencia de aCT. Para ello la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> fue incubada en medio líquido YPD suplementado con aCT y suero fetal bovino (20 µg/mL y 10 % respectivamente) durante

16 horas y determinamos la producción de Tup1 mediante *western blot*. Como se ve en la Figura 24A, la presencia de suero no afecta a los niveles de Tup1 en extractos celulares totales, ni a los niveles de la proteína fluorescente RFP y en estas condiciones, el sistema de regulación funciona eficazmente.

En presencia de 1 % de suero, la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> mostró un porcentaje de filamentación de 60 % tras 8 horas de crecimiento, mientras que este valor se elevó al  $75 \pm 3,3$  % aproximadamente en presencia de ambos inductores (suero al 1 % y aCT) (Figura 25B). Es destacable que utilizando la mayor concentración de suero la filamentación alcanzada es próxima al  $95 \pm 4,38$  % tras 8 horas (Figura 24B). La diferencia entre los porcentajes mostrados por la cepa en presencia de aCT es significativa tanto al añadir suero al 1% como al 10 %, en relación a los datos mostrados en el crecimiento sin antibiótico.



**Figura 24. Cinética de inducción de la filamentación en la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de suero**

A) Detección de las proteínas Tup1-myc y RFP-HA (con los anticuerpos Anti-myc y Anti-HA respectivamente) expresadas por la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en medio líquido YPD con y sin suero al 10 %. Las células crecieron durante 16 horas en ambas condiciones antes de obtener los extractos proteicos. B) Porcentajes de filamentación en presencia de suero de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en medios YPD y RPMI sin y con aCT a 20 µg/mL. Las células crecieron en medio YPD y a 37 °C durante 16 horas y

posteriormente fueron inoculadas a igual densidad óptica (0,01) e incubadas a la misma temperatura en cada uno de los medios analizados con y sin el antibiótico. En cada punto del tiempo se tomó el mismo volumen de cada cultivo y se contó al microscopio la cantidad de levaduras y de hifas en un campo homogéneo. Todos los datos mostrados son representativos de los resultados de dos ensayos en idénticas condiciones.

En un medio suplementado con suero al 10 % el porcentaje de filamentación a las 2 horas de crecimiento fue del 30% en presencia de aCT, mientras que sin este compuesto el porcentaje fue mucho menor (3 %). Este punto en el tiempo durante el crecimiento parece ser clave en la influencia de la aCT en la inducción de la filamentación de la cepa.

Estos resultados indican que el suero no altera, de forma significativa al menos, la regulación de la expresión de *TUP1* en la cepa. Sin embargo, al ser un inductor natural de la filamentación en *C. albicans*, su presencia sí se traduce en un incremento de la formación de hifas en la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> lo que parece indicar mecanismos de inducción independientes de la regulación vía expresión de *TUP1*. No obstante, el papel inductor de la aCT continúa siendo predominante en dichas condiciones.

### c) Influencia de la filamentación en la adhesión

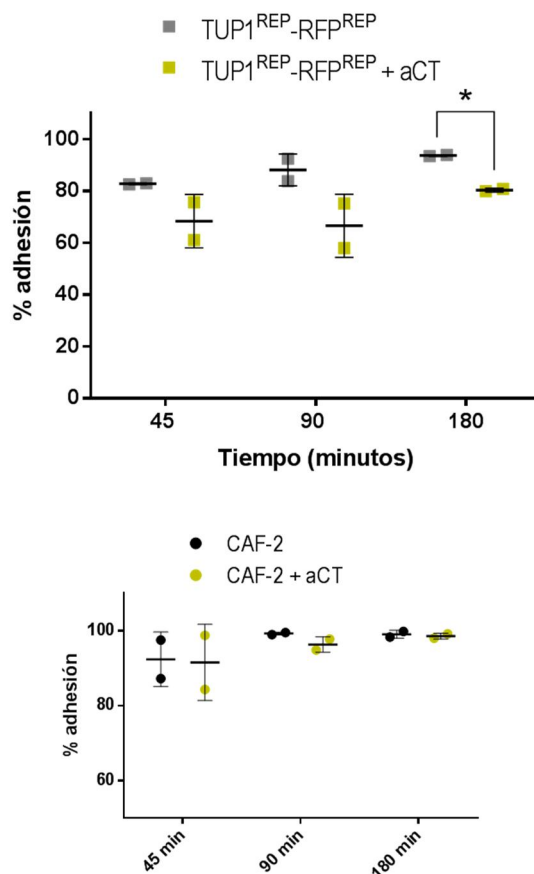
La adhesión de *C. albicans* a diversos materiales biológicos y a los tejidos del huésped es un mecanismo fundamental en su capacidad de causar infección. Su unión a superficies es un factor de virulencia importante siendo los catéteres una de las vías frecuentes de infección en el entorno hospitalario (Chandra *et al.*, 2001; Edmond *et al.*, 1999). La capacidad de adhesión también está estrechamente ligada a la filamentación, tal y como se ha descrito en mutantes morfológicos (como *ras1* y *efg1*) que a su vez muestran una reducida capacidad de adhesión (Modrzewska *et al.*, 2015). Por ello, nos planteamos conocer si la inducción de la filamentación en la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> influye en su capacidad de adhesión a poliestireno y a epitelio intestinal.

#### c.1. Adhesión a poliestireno

La adhesión *in vitro* al plástico poliestireno se llevó a cabo usando placas convencionales de 24 pocillos de cultivo de células de mamífero, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Se analizó la capacidad de adhesión de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> durante su incubación tras 45, 90 y 180 minutos en dichas placas en medio RPMI con 10% suero y con y sin aCT a 20 µg/mL. Previamente a la interacción, las células fueron incubadas durante 2 horas en el mismo medio con y sin el antibiótico, ya que al cabo de este tiempo el porcentaje de filamentación en presencia de aCT se incrementa en un 30 % (Figura 24). Al mismo tiempo, y como control, se analizó la adhesión de la cepa silvestre CAF2.

La cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> mostró una elevada capacidad de adhesión a plástico que aumenta a lo largo del tiempo, llegando a presentar un porcentaje de células adheridas del  $95 \pm 0,25$  % al cabo de 180 minutos de incubación. Por el contrario, la presencia de aCT

conllevara una notable reducción en la cantidad de células adheridas en los tres tiempos de incubación analizados. Esta disminución fue especialmente significativa ( $p=0,037$ ) al cabo de 180 minutos, cuando la capacidad de adhesión en presencia de aCT fue de un  $80 \pm 0,49$  % (Figura 25).



**Figura 25. Influencia de la filamentación en la adhesión a poliestireno de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>**

Se muestran los porcentajes de adhesión a placas de poliestireno de  $10^7$  células de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en medio RPMI completo (suplementado o no con aCT a 20  $\mu\text{g/mL}$ ) tras 45, 90 y 180 minutos de incubación a 37 °C. En la parte inferior, se muestra la adhesión de la cepa silvestre CAF2 en las mismas condiciones. \* $p<0,05$

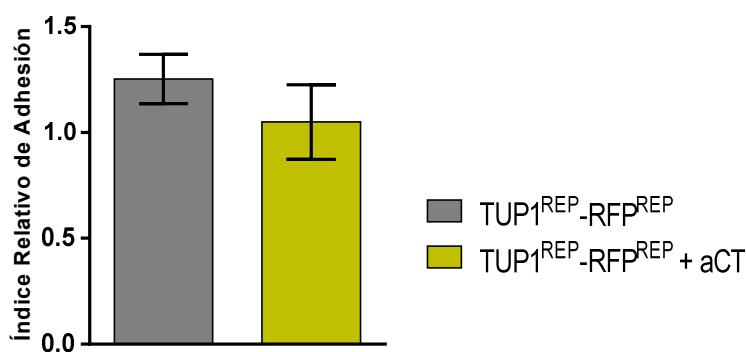
Para poder relacionar la adhesión con la filamentación de la cepa, se cuantificó el porcentaje de hifas adheridas a los pocillos al cabo de 180 minutos de incubación. La cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> mostró una filamentación del  $85 \pm 2$  % en ausencia de aCT y en presencia del antibiótico llegó aproximadamente hasta el  $99 \pm 0,5$  %.

Estos resultados indican que inducción de la filamentación en la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> con aCT reduce su capacidad de adhesión a poliestireno.

### c.2. Adhesión *ex vivo* a epitelio intestinal

En nuestro grupo de investigación se ha caracterizado un modelo de adhesión *ex vivo* a epitelio intestinal a fin de analizar la capacidad de adhesión de *C. albicans* a dicho tejido. Este modelo se basa en la interacción de células fúngicas con una porción de intestino delgado extraído de un ratón en condiciones de competición con células de un control interno. Ello nos permite determinar el nivel de adhesión de la cepa estudiada tras un intervalo de tiempo determinado mediante siembra y recuento de las células adheridas así como de las no adheridas (Materiales y Métodos).

Usando este modelo, la inducción de la filamentación en la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a epitelio intestinal redujo su índice relativo de adhesión de  $1,3 \pm 0,11$  a aproximadamente  $1 \pm 0,21$ . No se trata de una diferencia significativa estadísticamente pero sí apreciable en los tres ensayos independientes llevados a cabo (Figura 26).



**Figura 26. Adhesión *ex vivo* a intestino de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>**

Se muestra el nivel de adhesión a epitelio intestinal *ex vivo* de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia y ausencia de aCT a 20 µg/mL. Las barras de error indican el error estándar de la media entre 3 datos obtenidos en ensayos independientes y realizados en idénticas condiciones.

Los ensayos realizados sugieren que la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> no favorece su adhesión a las superficies analizadas. El aumento en la formación de hifas mediado por aCT conlleva una disminución en su capacidad de adhesión en los modelos *ex vivo* e *in vitro*, siendo especialmente significativa en poliestireno,

## 2. Estudio del papel del dimorfismo en la interacción de *C. albicans* con el hospedador

### A. Interacción con células fagocíticas

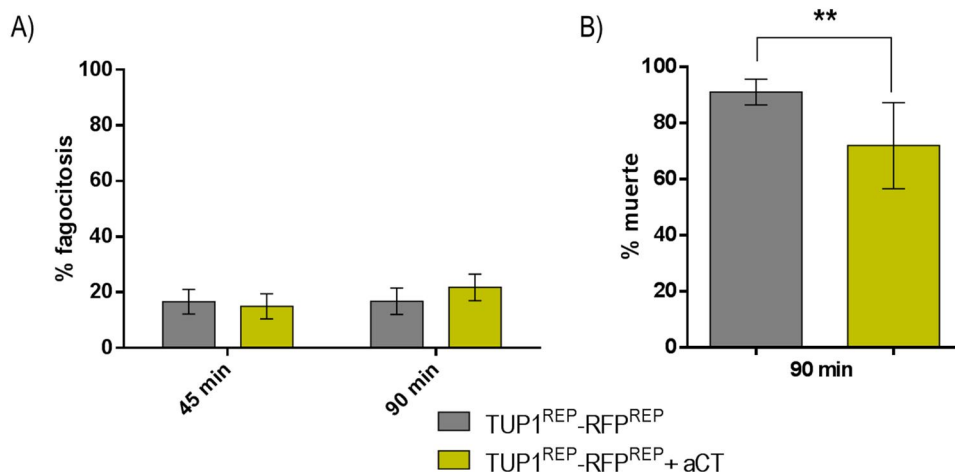
La respuesta inmune innata es la primera y más rápida línea de defensa del hospedador frente a la infección y es un proceso esencial para establecer el tipo de respuesta inmune adaptativa que se desarrollará frente patógeno. Durante la respuesta innata ejercen su función varias poblaciones de células, siendo crucial en la resolución de las candidiasis el papel de los fagocitos, principalmente macrófagos y neutrófilos (Romani *et al.*, 1998). Por ello, nos planteamos estudiar la influencia de la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en la susceptibilidad a la fagocitosis y lisis mediada por macrófagos y neutrófilos.

#### a) Estudios de interacción con macrófagos

Con intención de determinar la influencia de la filamentación en la capacidad de sobrevivir a la acción de macrófagos, se empleó la línea celular RAW 264.7. Esta línea deriva de una línea monocito/macrófago (Ralph *et al.*, 1977) y aunque su actividad candidicida es menor que la de macrófagos peritoneales de ratón, es superior a la de otras líneas celulares de macrófagos como J774, WEHI-3, ANA-1 y GG2EE (Vazquez-Torres *et al.*, 1995). Se ensayó su actividad fagocítica y fungicida frente a la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> así como el patrón de citoquinas expresadas en respuesta a dicha interacción; todos los estudios se realizaron durante 45 y 90 minutos de interacción a una MOI de 1:1.

La cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> muestra un porcentaje de fagocitosis de  $16,6 \pm 1,9$  % a los 45 minutos de interacción y un  $16,7 \pm 2,12$  % tras 90 minutos como se muestra en la Figura 27A. La presencia de aCT no produce cambios significativos en los porcentajes de fagocitosis de la cepa a dichos tiempos ( $14,9 \pm 2,24$  % tras 45 minutos y  $21,7 \pm 2,14$  % tras 90 minutos).

Sin embargo al medir la viabilidad de la cepa tras 90 minutos de interacción con los macrófagos, se observa que la presencia de aCT aumenta la resistencia de la cepa a la lisis por dichos fagocitos de manera significativa ( $p=0,002$ ) (Figura 27B). Los macrófagos mostraron una capacidad fungicida muy alta en ausencia de aCT, con una tasa de muerte del mutante de aproximadamente el  $91,1 \pm 1,28$  %, mientras que la presencia del antibiótico (y el aumento de filamentación), produce una disminución significativa de dicha actividad, disminuyendo la mortalidad de la levadura hasta el  $72 \pm 4,62$  %.



**Figura 27. Fagocitosis y muerte de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de macrófagos murinos RAW 264.7**

A) Porcentaje de fagocitosis de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> tras la interacción de 10<sup>5</sup> células durante 45 y 90 minutos con macrófagos RAW 264.7 a una MOI 1:1. Ambos tipos celulares fueron incubados en medio RPMI suplementado o no con aCT a 20 µg/mL. El porcentaje de fagocitosis fue calculado para cada caso como se indica en Materiales y Métodos. B) Porcentajes de muerte de 10<sup>5</sup> células de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> tras la interacción durante 90 minutos con macrófagos a una MOI 1:1 en medio RPMI con y sin aCT a 20 µg/mL. En ambos gráficos, la línea horizontal representa la media de cada grupo de datos y las barras de error indican el error estándar de la media. \*\* p<0,01.

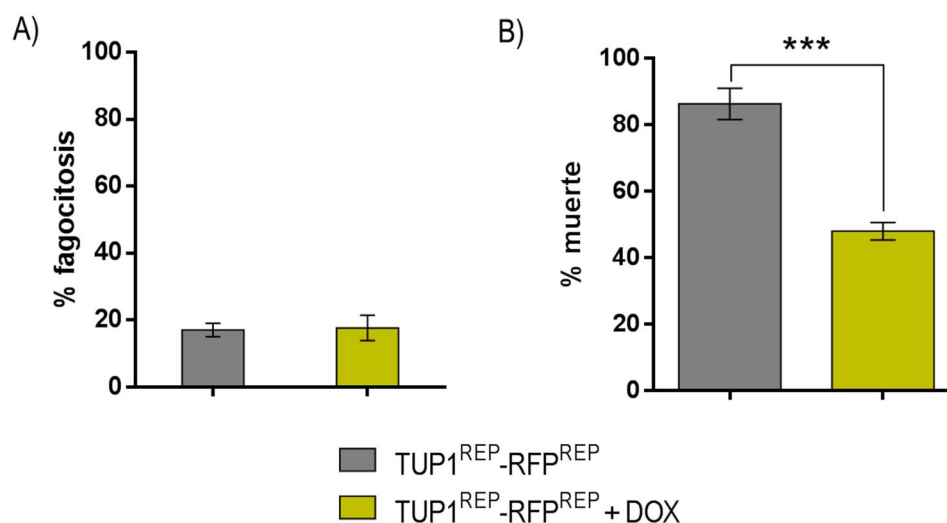
Estos datos nos permiten afirmar que durante la interacción con macrófagos la presencia de aCT, y por tanto el aumento de filamentación de la cepa, no cambia la fagocitosis de la misma pero si es menos susceptible a la lisis inducida por dichos fagocitos.

### b) Interacción con neutrófilos

Las células polimorfonucleares (PMNs) son uno de los primeros tipos celulares en migrar al sitio de inflamación y presentan una capacidad fungicida muy elevada. Se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis y actividad fungicida con neutrófilos peritoneales murinos obtenidos de ratones tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Se analizó la susceptibilidad de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a la actividad de dichos neutrófilos a una MOI de 1:1 durante 60 y 120 minutos. Todos estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Luigina Romani en la Universidad de Perugia.

Tal y como se muestra en la Figura 28A, después de 60 minutos, los neutrófilos murinos fagocitaron alrededor de un 17,6 ± 2,18 % de las células fúngicas, dato que no varió al añadir antibiótico al medio (17 ± 1,15 %). Los ensayos de actividad anti-*Candida* se llevaron a cabo durante 2 horas en condiciones similares a las descritas anteriormente. En ausencia del antibiótico, se observó un 86,3 ± 2,72 % de muerte de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. Una vez más, la presencia del antibiótico provoca una reducción significativa

( $p=0,0003$ ) en la actividad fungicida, ya que en esta condición los valores de muerte se reducen al  $48 \pm 1,52$  %. (Figura 28).



**Figura 28. Fagocitosis y muerte de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en interacción con células PMNs**

A) Porcentaje de fagocitosis de neutrófilos peritoneales murinos tras la interacción con  $10^5$  células de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> durante 1 hora en medio RPMI con y sin doxiciclina a 20  $\mu\text{g/mL}$ . Ambos tipos celulares se incubaron a una MOI de 1:1. B) Porcentaje de muerte de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> tras la interacción con neutrófilos durante 2 horas en medio RPMI con y sin el antibiótico. En ambos gráficos se muestra la media y el error estándar de la media. \*\*\* $p<0,001$

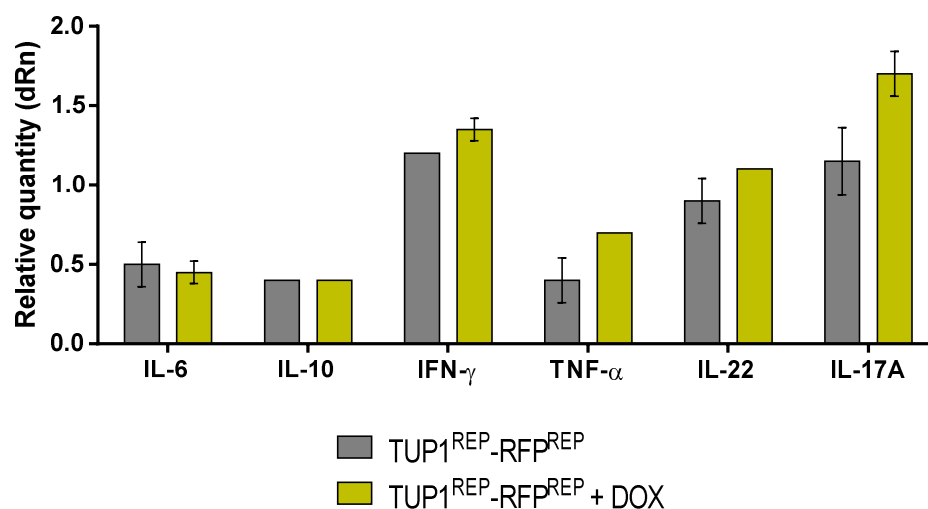
Una vez más, la presencia de aCT, y por tanto el aumento de filamentación de la cepa, no modifica la fagocitosis pero si la lisis inducida por los neutrófilos.

Los estudios de interacción con células fagocíticas muestran claras diferencias en la susceptibilidad que muestran las dos morfologías de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> frente a la actividad de células fagocíticas. A pesar de que la inducción de la filamentación de dicha cepa no parece afectar al porcentaje de fagocitosis, los datos relativos a la supervivencia ponen de manifiesto una mayor resistencia de la forma filamentosa al ataque tanto de neutrófilos como de macrófagos.

Uno de los procesos más importantes llevados a cabo por las células inmunitarias tras el reconocimiento de patógenos es, además de la fagocitosis, la liberación de citoquinas. Algunas de ellas presentan una acción proinflamatoria, como la IL-6 y el TNF- $\alpha$ , producidas rápidamente por células fagocíticas tras su interacción con el hongo (Presterl *et al.*, 1999). El TNF- $\alpha$  es esencial en el control de la candidiasis, ya que su neutralización favorece el avance de la enfermedad (Netea *et al.*, 1995). La IL-10, sin embargo, presenta función antiinflamatoria, siendo capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de los linfocitos T o los macrófagos.



Además de la actividad fagocítica y fungicida, quisimos determinar si la expresión de citoquinas por parte de los neutrófilos se veía afectada por la inducción de la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. Así, analizamos la expresión diferencial de determinadas citoquinas frente al mutante con y sin doxiciclina, con intención de determinar la influencia de la filamentación en dicho patrón de citoquinas expresadas por los neutrófilos. Como la forma de medida más eficiente y reproducible del nivel de citoquinas es la utilización de la RT-PCR, realizamos este análisis tras una interacción de 16 horas a 37 °C de ambos tipos celulares a una MOI de 1:1. Se analizaron los niveles de expresión de las citoquinas IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-22 y TNF- $\alpha$  (ver Materiales y Métodos). Por un lado los neutrófilos en presencia de la cepa y en ausencia de aCT, muestran una expresión relativamente baja de las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , mientras que las citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-22 presentan niveles más elevados (Figura 29). La presencia de aCT no modifica los niveles de las citoquinas IL-6 e IL-10; sin embargo, la inducción de la filamentación provoca un ligero aumento en las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  e IL-22, siendo más acusado este efecto en la IL-17A.



**Figura 29. Patrón de expresión de citoquinas en células PMNs en interacción con *C. albicans***

Se muestran los niveles de expresión de las citoquinas indicadas durante la interacción de células PMNs con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> con y sin doxiciclina a 20  $\mu$ g/mL durante 16 horas y a una MOI de 1:1. Todos los valores fueron normalizados con el dato correspondiente a PMNs sin células fúngicas (columnas en blanco), cuyo valor se toma como 1.

Estos estudios de interacción con células fagocíticas han puesto de manifiesto que la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, no modifica su fagocitosis pero sí la hace ser más resistente a la lisis tanto de neutrófilos como de macrófagos. También hemos detectado que la filamentación no altera los niveles de las citoquinas de respuesta T<sub>H</sub>2 como son IL-6 e IL-10, pero sí aumenta los niveles de las citoquinas pro inflamatorias IFN-

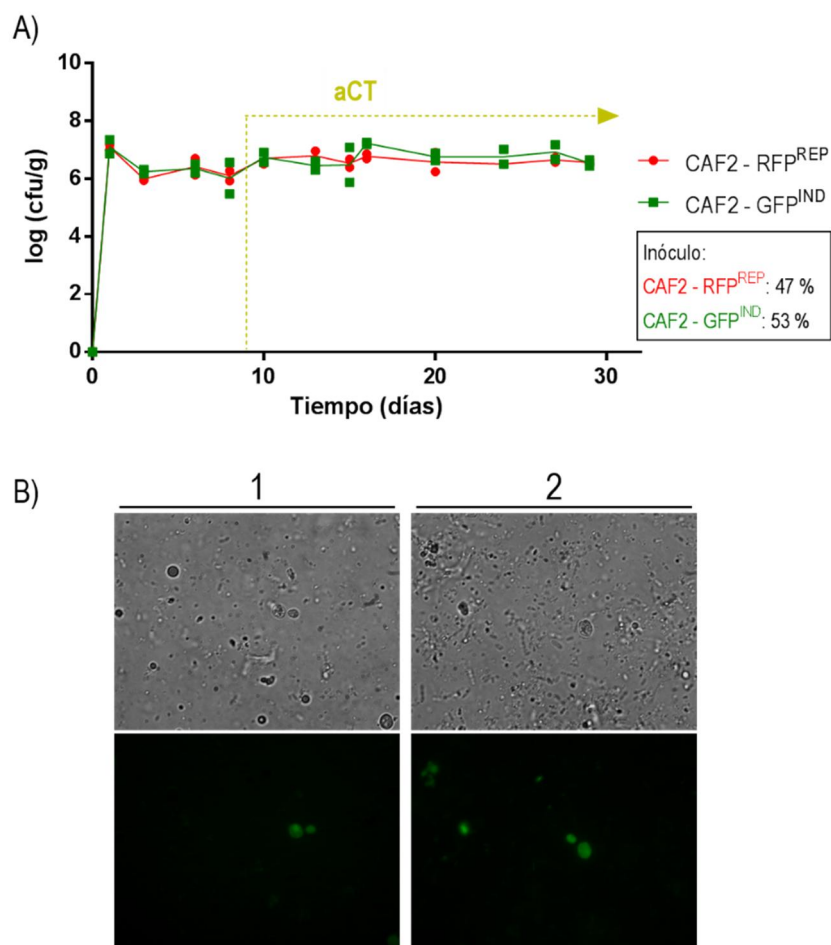
y y TNF- $\alpha$ , siendo más acusada la influencia de la filamentación en el incremento de la expresión de las citoquinas de tipo T<sub>H</sub>17, como son la IL-22 y sobre todo la IL-17A.

## B. Estudio del dimorfismo en la colonización intestinal

Una vez caracterizado el comportamiento de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> *in vitro*, nos planteamos analizar la influencia de la filamentación *in vivo* empleando un modelo murino de colonización gastrointestinal. El modelo de colonización intestinal caracterizado por nuestro grupo de investigación (Prieto *et al.*, 2014) se basa en una única administración de una dosis de 10<sup>7</sup> células de *C. albicans* en ratones previamente tratados con un cóctel de antibióticos (estreptomycina 2 g/L, bacitracina 1 g/L y gentamicina 0,1 g/L) en el agua de bebida. Este tratamiento permite la colonización intestinal y posibilita que la colonización (estimadas mediante el recuento de CFUs por gramo de heces) se mantenga durante meses.

Del mismo modo que anteriormente validamos el empleo de la aCT *in vitro*, nos planteamos validar su papel como inductor de la filamentación en este modelo de colonización intestinal. En nuestros experimentos utilizamos una concentración de aCT de 1 mg/mL administrado oralmente tras 8-10 días de la inoculación oral del hongo y tras confirmación de su establecimiento estable. Se realizó en primer lugar un ensayo de colonización empleando como inóculo una mezcla de cepas cuya fluorescencia fuera regulada positiva y negativamente por el antibiótico (CAF2-RFP<sup>REP</sup> (fluorescencia roja RFP reprimible) y CAF2-GFP<sup>IND</sup> (proteína fluorescente verde GFP inducible)). La mezcla de cepas en proporción 1:1 se inoculó por vía intragástrica en un grupo de ratones previamente tratados con el cóctel de antibióticos.

Los datos de alojamiento en heces muestran como ambas cepas se establecieron correctamente en el intestino tras la inoculación, mostrando valores similares de entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> CFUs/g. Dichos valores se mantuvieron constantes a lo largo de todo el ensayo hasta un total de 30 días. La adición de aCT de forma oral (en el agua de bebida) se realizó a día 9 tras el comienzo de la colonización y se mantuvo hasta el final del ensayo. A partir de este día, no se detectaron alteraciones en la colonización de ninguna de las dos cepas estudiadas, mostrando valores de alojamiento en heces similares a los obtenidos en ausencia de aCT (Figura 30A). Tampoco se detectó una diferencia significativa de las proporciones de ambas cepas en la población intestinal, indicando que la expresión de los genes reporteros no alteraba significativamente la adecuación biológica (*fitness*) de la cepa. Pudimos, además, visualizar fluorescencia verde en muestras de heces procedentes de ratones a los 20 días (Figura 30B).



**Figura 30. Tratamiento con aCT durante la colonización por *C. albicans***

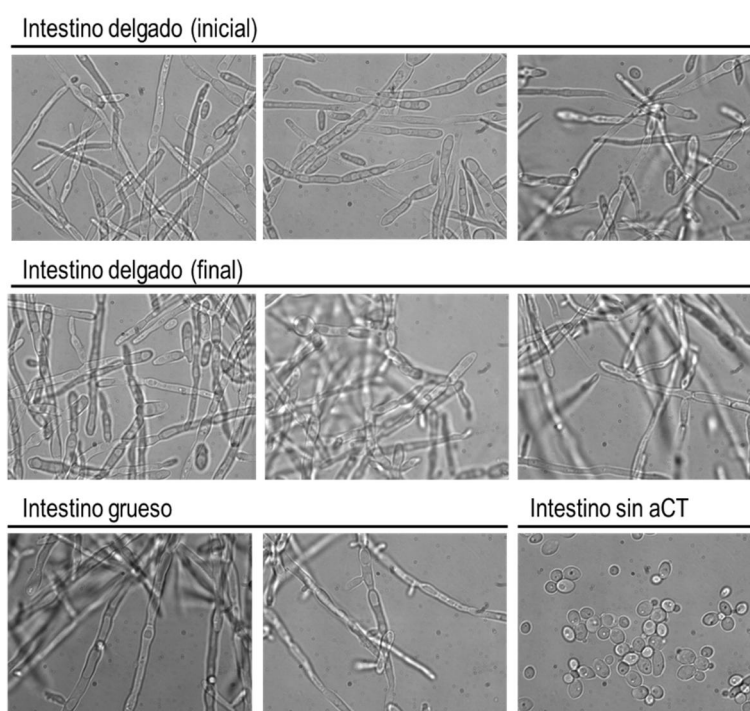
A) Valores logarítmicos de unidades formadoras de colonia (CFUs) obtenidas por gramo de heces de un grupo de ratones colonizados a día 0 vía intragástrica con un inóculo ( $10^7$  células) de dos cepas silvestres: CAF2-RFP<sup>REP</sup> (RFP reprimible por doxiciclina) y CAF2-GFP<sup>IND</sup> (GFP inducible por el antibiótico). La cantidad de células de cada cepa para realizar la suspensión del inóculo fue calculada en proporción 50:50. Los porcentajes reales fueron comprobados mediante la siembra y el recuento de CFUs de dicho inóculo. La línea discontinua amarilla indica el día en el que se introdujo el aCT a 1 mg/mL en el agua de bebida. B) Visualización en heces de la expresión de GFP inducida por el tratamiento con aCT a día 20 del experimento. Los paneles 1 y 2 corresponden a muestras obtenidas de diferentes ratones.

La visualización de fluorescencia verde nos indica el correcto funcionamiento de la aCT como compuesto inductor del promotor TET en el interior del intestino. Dado que el sistema inducible requiere de una cantidad de aCT mayor que el reprimible, la concentración empleada en este estudio (1 mg/mL) parece ser suficiente para el funcionamiento de este sistema de regulación en sus dos versiones.

### a) Detección de aCT en intestino

Puesto que desconocemos el grado de biodisponibilidad y actividad de la aCT en las distintas porciones del intestino, se llevó a cabo un bioensayo para estimar dicho valor en el tracto gastrointestinal de los ratones colonizados con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. Se utilizó un tratamiento oral de 1 mg/mL de aCT. Tras 7 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y sus correspondientes intestinos divididos en tres secciones (porciones inicial y final del intestino delgado e intestino grueso) para realizar la cuantificación del antibiótico en cada una de ellas. Las regiones de intestino, libres de su contenido, fueron homogeneizadas en PBS y empleadas para suplementar el medio en el que se incubó con TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. Tras 16 horas de crecimiento, se observó al microscopio la morfología celular.

Como se observa en la Figura 31, en todos los casos se apreció un crecimiento filamentososo. Dicha morfología hifal no fue apreciable en muestras procedente de un intestino tratado con el cóctel estándar de antibióticos pero sin aCT, lo que descarta que la filamentación de la cepa pudiera ser debida a la presencia de otros inductores presentes en el intestino de ratones colonizados.



**Figura 31. Presencia de aCT en el intestino de ratones tratados**

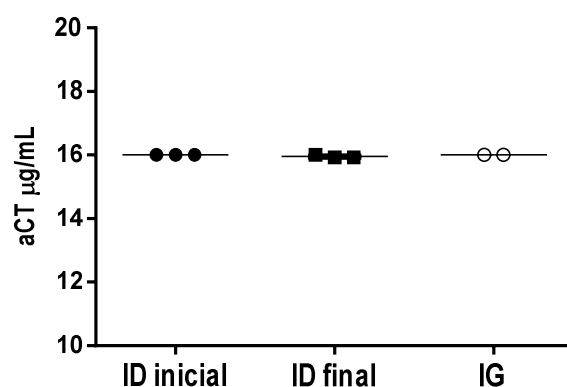
Morfología de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de porciones de intestino de ratones previamente tratados con aCT a 1 mg/mL en el agua de bebida. Distintas zonas del intestino (porciones inicial y final de intestino delgado e intestino grueso) fueron extraídas y homogeneizadas en PBS estéril, para separar después la fase acuosa de los restos de tejido. Las imágenes fueron tomadas tras un crecimiento durante 16 horas de la cepa en presencia de dichas muestras a una dilución 1/10 en medio YPD y a 37 °C. Cada una de las imágenes de cada región corresponde a un ratón diferente. En

la esquina inferior derecha se muestra el crecimiento de la misma cepa incubada con una muestra obtenida de un ratón sin tratar con aCT.

Estos datos indican que la concentración de 1 mg/mL de aCT en la bebida es suficiente para inducir el crecimiento filamentosos de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a lo largo de todo el tracto gastrointestinal. Para determinar la concentración aproximada a la que se encuentra el antibiótico en cada una de las porciones analizadas, cultivamos la cepa de referencia en medio de cultivo YEPD suplementado con cantidades crecientes de contenido intestinal.

El cultivo con mayor concentración de intestino dio lugar a un crecimiento filamentosos de la cepa, mientras que las sucesivas diluciones mostraron ambas morfologías. Las concentraciones más bajas solamente dieron lugar a una morfología levaduriforme de la cepa (datos no mostrados). Para tener certeza de que la cepa filamenta por la presencia de aCT en el intestino y no por otros factores de inducción, se incubó en paralelo una cepa silvestre (CAF2) con una de las muestras de intestino. Sin embargo, no se observó filamentación alguna en esta cepa, lo que de nuevo nos confirma la especificidad de la aCT en la regulación de la expresión el interior del tracto intestinal.

Para determinar la concentración de aCT en las distintas porciones de intestino, se observó la morfología que presentaba la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de cantidades decrecientes de los correspondientes homogeneizados. Se calculó la concentración de aCT según se detalla en materiales y métodos, siendo el valor obtenido de aproximadamente 16 µg/ml en todas las regiones de los intestinos analizados (Figura 32).



**Figura 32. Concentración de aCT en el intestino de ratones tratados con el antibiótico**

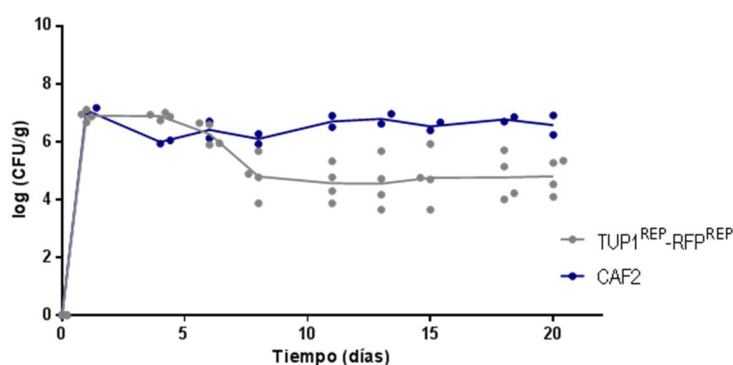
Valores de concentración de aCT en µg/mL en las porciones de intestino indicadas (ID: intestino delgado, IG: intestino grueso) obtenidas de ratones previamente tratados durante 7 días con aCT a 1 g/L en el agua de bebida.

Teniendo en cuenta que la concentración aCT mínima para inducir la filamentación por completo en esta cepa es de 0,08  $\mu\text{g/mL}$ , podemos considerar que la administración oral de 1 mg/ml es suficiente para regular el crecimiento filamentoso en el interior del intestino.

### b) Influencia de la filamentación durante la colonización intestinal

Hasta el momento no se hay evidencias de la implicación de la filamentación en la colonización intestinal de *C. albicans*. A pesar de que la forma filamentosa del hongo se considera directamente relacionada con la invasión de tejidos, también se ha descrito la expresión de genes inductores de la filamentación durante la etapa comensal del hongo (Mochon *et al.*, 2010; Naglik *et al.*, 2006; Naglik, Rodgers, *et al.*, 2003; Rosenbach *et al.*, 2010). Así mismo se ha descrito cómo la cepa mutante *hog1* (Alonso-Monge *et al.*, 1999), que muestra una mayor capacidad de filamentar (comparado con una cepa parental) es incapaz de establecer una colonización en intestino (Prieto *et al.*, 2014).

Antes de analizar la influencia de la filamentación en la colonización, quisimos conocer la capacidad de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> de colonizar el intestino en relación a la presentada por una cepa silvestre. Así realizamos en paralelo sendas colonizaciones en grupos independientes de ratones en las mismas condiciones descritas previamente. La cepa CAF2, tal y como se ha descrito anteriormente, mostró valores de aproximadamente 10<sup>7</sup> CFUs/g desde el día posterior a la inoculación y durante los 20 días totales que duró el ensayo (Figura 35). Por otro lado, la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> se estableció en el intestino mostrando durante los primeros 7 días valores similares a los de la cepa silvestre (10<sup>7</sup> CFUs/g). En los días siguientes, estos valores decrecieron hasta 10<sup>5</sup> CFUs/g aproximadamente y se mantuvieron alrededor de dicho valor hasta el fin del ensayo (20 días) (Figura 33).

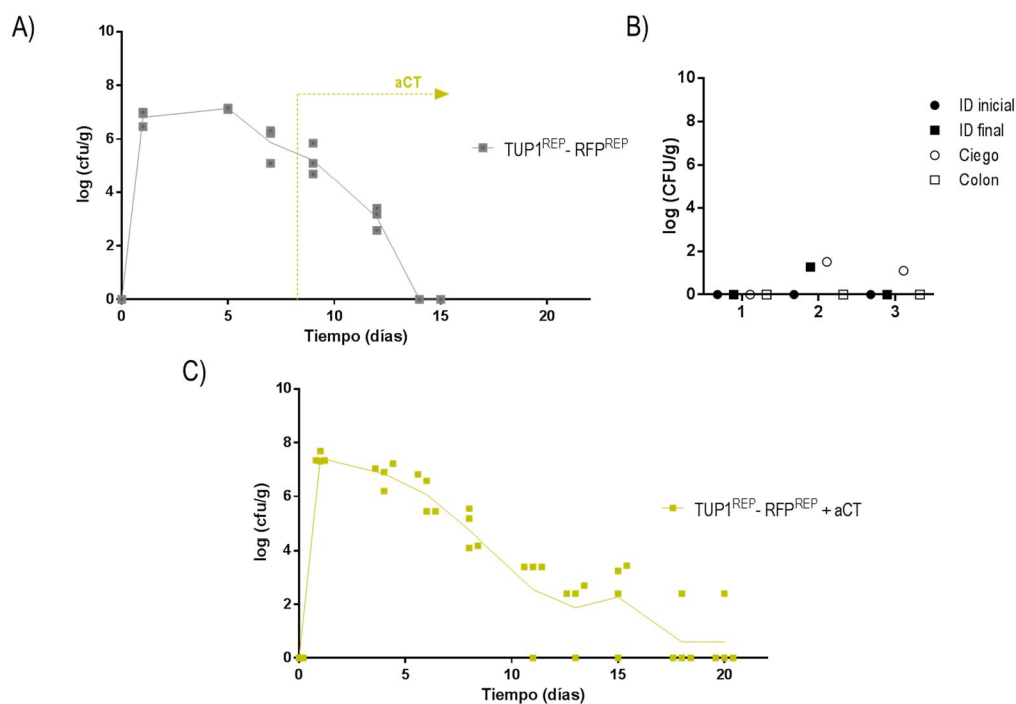


**Figura 33. Colonización de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>**

Valores logarítmicos de unidades formadoras de colonia (CFUs) por gramo de heces tomadas de un grupo de ratones (n=4) colonizados con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. En azul se muestra la colonización de la cepa silvestre (CAF2) en un ensayo independiente. En ambos se administró el tratamiento antibiótico estándar desde 3 días previos a la inoculación y durante los 20 días de colonización.

Como vemos en la figura, la capacidad de colonización del mutante es sensiblemente inferior (de hasta 2 unidades logarítmicas), pero se mantiene constante a lo largo de todo el experimento.

Una vez analizada la capacidad de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> para colonizar el intestino, en los siguientes ensayos analizamos la influencia de la filamentación en la colonización. Para ello, adicionamos, al cabo de 8 días de colonización, 1 mg/mL de aCT en el agua de bebida para reprimir TUP1 y generar la filamentación de las células en el interior del tracto intestinal, tal y como se describe en la Figura 34.



**Figura 34. Efecto de la inducción de la filamentación en la colonización gastrointestinal**

A) Valores logarítmicos de unidades formadoras de colonia por gramo de heces obtenidas desde el inicio de la inoculación intragástrica de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> ( $10^7$  células). El tratamiento antibiótico estándar en el agua de bebida se inició 3 días previos a la inoculación y a día 8 se añadió la aCT a 1 mg/mL. B) Alojamiento de *C. albicans* en distintas regiones de intestinos procedentes de los ratones correspondientes al ensayo del apartado, análisis post mortem día 15 C) Colonización de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> ( $10^7$  células) en ratones tratados con el cóctel estándar de antibióticos más aCT a 1 mg/mL desde 3 días previos a la inoculación y durante todo el ensayo.

La adición de aCT, provoca un claro descenso en los valores de alojamiento en heces, pasando de  $10^5$  a  $10^3$  CFUs/g hasta perder su detección 7 días más tarde (Figura 34A). Los intestinos de los ratones fueron extraídos a día 15 y sembrados en medio SD para determinar el alojamiento de *C. albicans*. La ausencia de crecimiento en las placas (Figura 34B) confirmó la pérdida de colonización de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en forma filamentosa.



Estos resultados sugieren que la forma filamentosa no parece ser capaz de mantenerse, una vez establecida en el intestino y se acaba eliminando. Una vez más verificamos que la concentración empleada de aCT en el agua de bebida es la adecuada.

Por otra parte, se analizó la implicación de la filamentación de la cepa desde el inicio de la colonización intestinal. Para ello, otro grupo de ratones fue tratado con aCT en el agua de bebida junto al resto de antibióticos desde 3 días previos a la inoculación y durante todo el ensayo. De esta forma se inducirá la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> desde el comienzo del experimento.

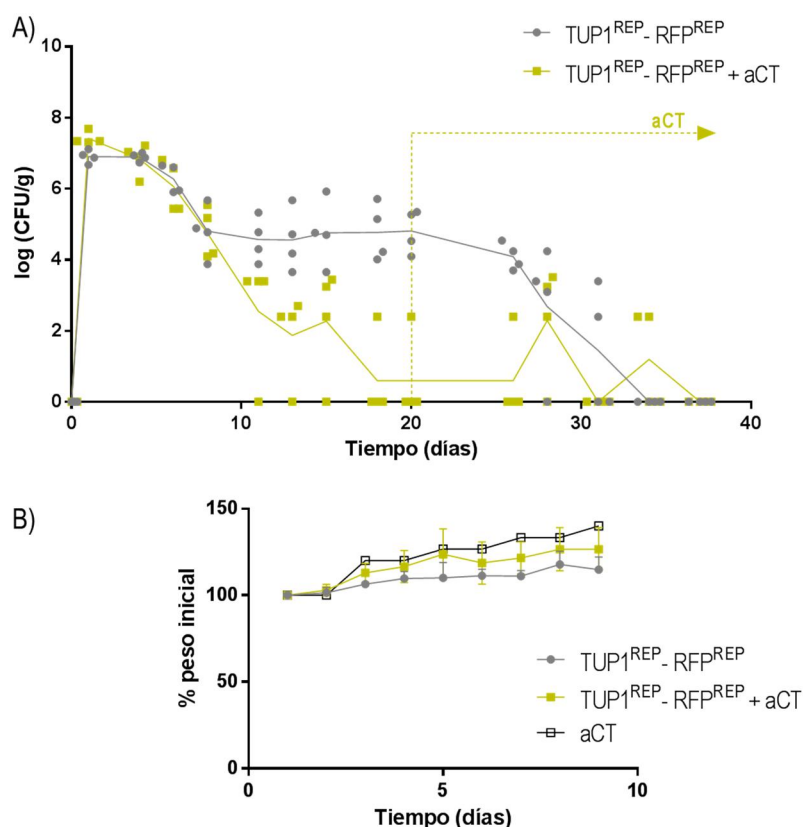
En este estudio pudimos observar que la cepa en presencia de aCT nunca llega a establecerse, con unos valores de aproximadamente  $10^7$  CFUs/g pero sólo al día siguiente de la inoculación, ya que en los días posteriores, se produjo una disminución del nivel de colonización hasta  $10^5$  CFUs/g aproximadamente. Estos valores continuaron descendiendo hasta que se produjo la pérdida de detección a día 20 del ensayo (Figura 34C). Una vez más, estos datos sugieren que la filamentación de la cepa le impide establecerse y poco a poco va desapareciendo del tracto gastrointestinal.

Para poder relacionar la colonización con la inducción de la filamentación y con la presencia de aCT, unimos a este grupo de animales, un grupo control de ratones colonizados con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en el mismo lecho. En ese momento el grupo control, cuya colonización es baja pero estable, comenzará a recibir aCT en el agua de bebida; a la vez, el otro grupo podría re-inocularse como consecuencia de la coprofagia, al estar en contacto con ratones colonizados.

El grupo control comenzó a mostrar valores de alojamiento en heces cada vez más bajos, hasta perderse por completo 15 días después de la unión de los dos grupos. El grupo previamente tratado con aCT llegó a mostrar valores de alrededor de  $10^3$  CFUs/g debido al contacto con ratones colonizados, pero tras los 15 días de ensayo y debido al tratamiento con aCT, la detección en heces acabó por ser nula de nuevo (Figura 35A).

Para verificar el bienestar de los animales durante todos los experimentos y que tanto los tratamientos como la colonización fúngica no causaran daños colaterales, se pesaron tanto los ratones colonizados como un grupo control sin colonizar pero tratado con el cóctel estándar de antibióticos y aCT. El peso de todos los ratones evolucionó de manera creciente y normal, lo que indica el buen estado de salud de los animales (Figura 35B).





**Figura 35. Colonización de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de aCT**

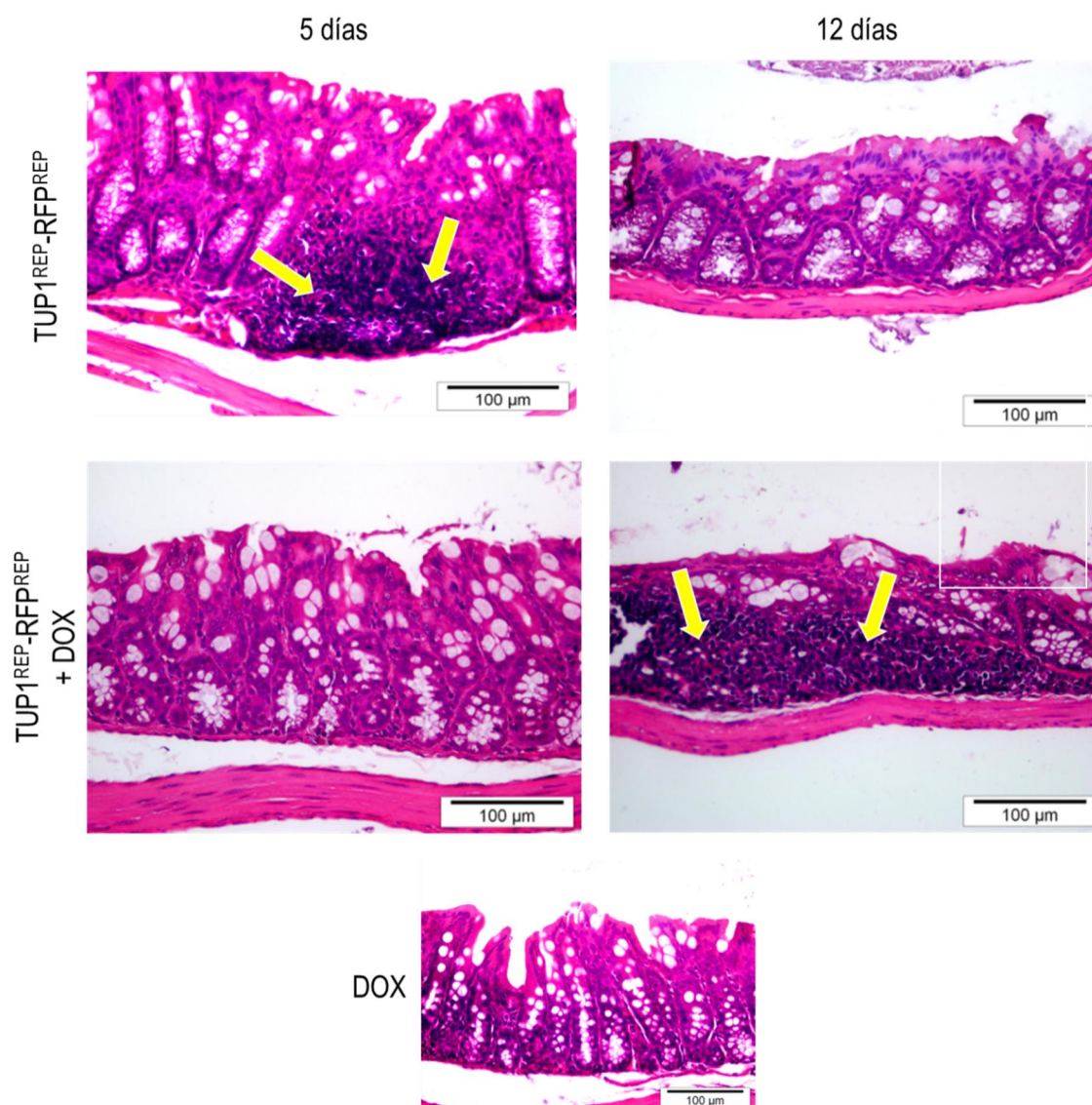
A) Nivel de colonización de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia y ausencia de aCT a 1 mg/mL en el agua de bebida. Se muestran los valores logarítmicos de CFUs por gramo de heces obtenidas cada 2-3 días de dos grupos de ratones. Ambos tratamientos se iniciaron 3 días previos a la inoculación intragástrica de  $10^7$  células. La línea discontinua indica el tiempo durante el cual todos los ratones compartieron el mismo espacio y fueron tratados con aCT. B) Peso de los individuos de cada grupo, en función de su valor inicial, durante los primeros 10 días del experimento. El grupo aCT corresponde a un grupo control tratado con aCT pero sin colonizar con *C. albicans*.

Los datos obtenidos indican, por tanto, que la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> presenta valores de alojamiento de alrededor de  $10^5$  CFUs/g y que estos se mantienen constantes a lo largo de los 20 días de colonización. La administración de aCT, sin embargo, provoca la disminución de la tasa de colonización intestinal. Estos datos nos permiten confirmar como la inducción de la filamentación de la cepa disminuye su capacidad de colonizar el intestino.

#### **b.1. Influencia de la filamentación en la respuesta inflamatoria**

Con objeto de analizar si la filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> provocaba un daño en la mucosa intestinal, se obtuvieron y tiñeron cortes histológicos a dos tiempos (días 5 y 12), en ratones previamente colonizados en presencia y ausencia del antibiótico tal y como se describe en Materiales y Métodos.

La visualización de dichos cortes al microscopio mostraba que en ausencia del antibiótico, se detectaban daños en la mucosa intestinal en las etapas tempranas de la colonización (5 días), mientras que al cabo de 12 días se resuelve el proceso inflamatorio. Por el contrario, la inducción de la filamentación ocasiona un mayor daño en el intestino a tiempos largos. El intestino proveniente de ratones tratados con antibiótico pero sin colonizar mostraba aspecto sano, descartando así que el antibiótico tenga cierta implicación en el daño al tejido (Figura 36).



**Figura 36. Histología de colon en ratones colonizados**

Cortes histológicos procedentes del colon de ratones colonizados con las cepas y tiempos indicados. Las flechas amarillas señalan la presencia de *C. albicans* en el tejido y el daño causado en éste. Los tejidos fueron embebidos en parafina para realizar los cortes, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina para su visualización. En la parte baja se muestra el corte histológico correspondiente a un ratón tratado con doxiciclina a 1 mg/mL pero no colonizado.

La colonización de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> origina cierta inflamación en el colon en los primeros días tras la inoculación, inflamación que se resuelve al cabo de 12 días no

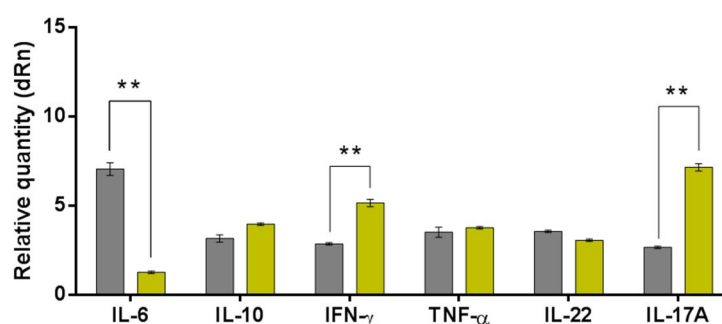
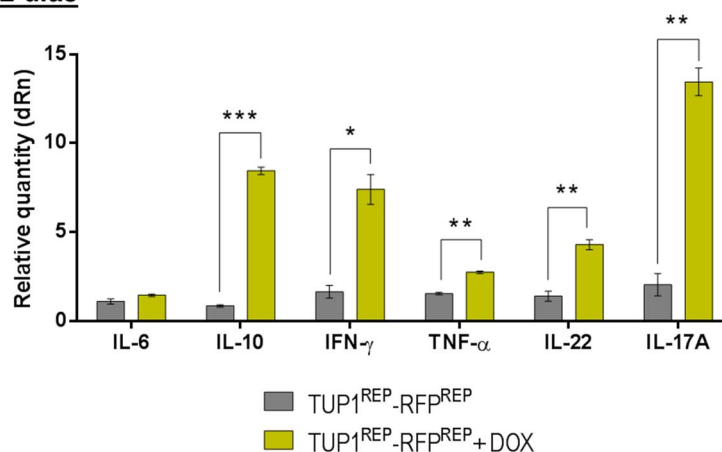
observándose ya daños apreciables en el intestino. Sin embargo, la inducción de la filamentación (generada desde el inicio del experimento) ocasiona un daño histológico significativo en la mucosa a los 12 días de la colonización.

Con el objetivo de determinar qué citoquinas se expresaban en el intestino de ratones colonizados con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, se analizó mediante RT-PCR los niveles de expresión de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-22. Posteriormente se estudió como afectaba la filamentación a dicho patrón de citoquinas.

Tras inocular con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> dos grupos independientes de ratones (uno de ellos tratado previamente con aCT) se obtuvieron los intestinos tras 5 y 12 días de colonización. La región del colon fue la utilizada para llevar a cabo la extracción de RNA y posterior cuantificación de citoquinas por RT-PCR.

En ausencia del antibiótico, la mayor parte de las citoquinas mostraron niveles de expresión similares, las cuales disminuían ligeramente a lo largo de los días de colonización. La citoquina IL-6, que mostró el nivel de expresión más alto en los primeros días, también disminuyó su expresión a día 12 de colonización alcanzando niveles similares al del resto de las citoquinas. En los ratones donde se indujo la filamentación de la cepa por adición del antibiótico, detectamos que, en general, los niveles de expresión de dichas citoquinas eran más altos y aumentaban a lo largo de la colonización, siendo especialmente elevada la expresión de IL-17A. Comparando los datos de expresión en las muestras de ratones tratados y sin tratar con antibiótico, en los primeros días de la colonización se detectaron diferencias significativas en la expresión de ciertas citoquinas: IL-6 (de  $7 \pm 0,25$  a  $1,25 \pm 0,05$ ), IFN- $\gamma$  (de  $2,8 \pm 0,05$  a  $5,15 \pm 0,15$ ), e IL-17A (de  $2,6 \pm 0,05$  a  $7,1 \pm 0,15$ ).

Por último, a los 12 días de colonización, se observó un incremento significativo en los niveles de IL-10 (de  $0,85 \pm 0,05$  a  $7,6 \pm 0,15$ ), IFN- $\gamma$  (de  $1,64 \pm 0,2$  a  $7,4 \pm 0,6$ ), e IL-22 (de  $1,4 \pm 0,2$  a  $4,3 \pm 0,2$ ). Es de resaltar también que el aumento de expresión de la IL-17A (de  $2 \pm 0,45$  a  $13,4 \pm 0,5$ ) es especialmente significativo (Figura 37).

**5 días****12 días**

**Figura 37. Expresión de citoquinas durante la colonización por *C. albicans***

Niveles de expresión de distintas citoquinas en la colonización de las cepas CAF2 y TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> con y sin doxiciclina a 1 mg/mL. Los intestinos fueron extraídos a días 5 y 12 tras el inicio de la colonización y se extrajo RNA del colon para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR. Todos los datos fueron normalizados frente a los valores correspondientes a ratones control (sin tratar). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

Los datos de histología y de la expresión de citoquinas respaldan que la inducción de la filamentación modifica el tipo de respuesta inflamatoria generada en el intestino por la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. La forma filamentosa causa una mayor inflamación en el colon, a la vez que aumenta la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-17A, citoquinas relacionadas con la respuesta de inflamatoria tipo T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17.

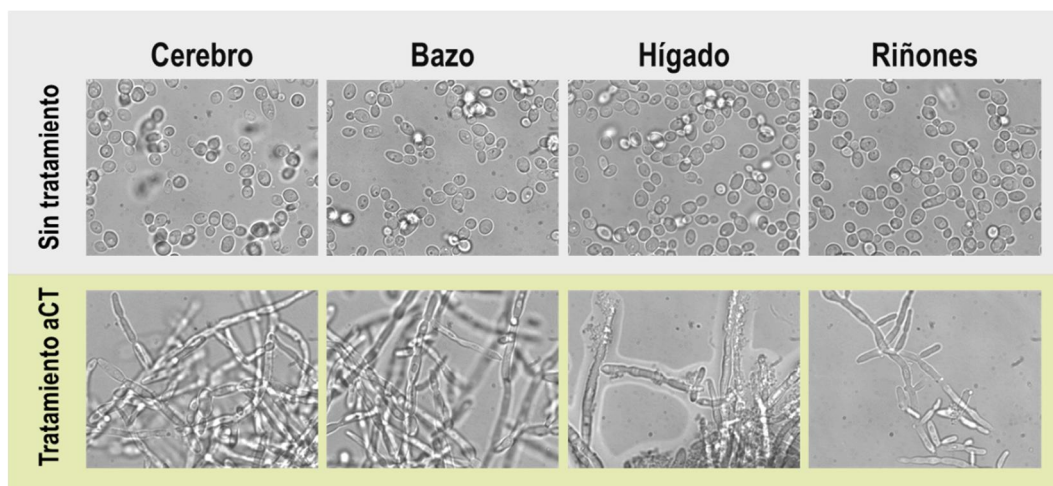
### C. Estudio del papel del dimorfismo durante el curso de una infección sistémica

El modelo de infección sistémica de ratón ha sido el más frecuentemente utilizado en estudios de virulencia de *C. albicans* (Mayer *et al.*, 2013; Navarro-Garcia *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2009). En este modelo, se inocula el hongo directamente

en la vena lateral de la cola y se analiza la mortalidad a lo largo del tiempo de la infección. Durante este periodo se sigue el peso del animal como indicativo del grado de infección desarrollada y se determina el alojamiento fúngico en órganos diana como el cerebro, el bazo, el hígado y, especialmente, los riñones. En este trabajo se ha utilizado este modelo para caracterizar la importancia de la filamentación durante el curso de una infección sistémica usando la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>.

En primer lugar, determinamos si la aCT es capaz de regular la filamentación en los distintos órganos del animal a partir de un tratamiento oral. Así, se analizaron los órganos diana de ratones tratados durante 10 días con 1 mg/mL de aCT en el agua de bebida. Se extrajeron los cerebros, bazos, hígados y riñones de los ratones de ambos grupos y se homogeneizaron de forma similar a las porciones de intestino obteniéndose muestras que fueron empleadas para suplementar el medio de cultivo en el que incubamos la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> (Materiales y Métodos).

Tal y como pudimos observar, la cepa mostró un fenotipo filamentoso en presencia de las muestras procedentes de ratones tratados con aCT. Las muestras de cerebro, bazo, hígado y riñones dieron lugar a la formación de hifas mientras que las correspondientes a ratones sin tratar no afectaron a la morfología levaduriforme de la cepa (Figura 38).



**Figura 38. Presencia de aCT en órganos diana tras un tratamiento oral**

Filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en presencia de órganos obtenidos de ratones previamente tratados con aCT a 1 mg/mL en el agua de bebida. La cepa fue incubada con los homogeneizados de órganos a una dilución 1/10 en medio YPD, a 37 °C y durante 16 horas. Los órganos fueron extraídos tras 10 días de tratamiento (panel de abajo) o no (panel de arriba) con aCT en el agua de bebida.

Este bioensayo indica que la cantidad de aCT presente en órganos diana es suficiente para inducir el crecimiento filamentoso de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> tras el régimen de administración oral indicado.

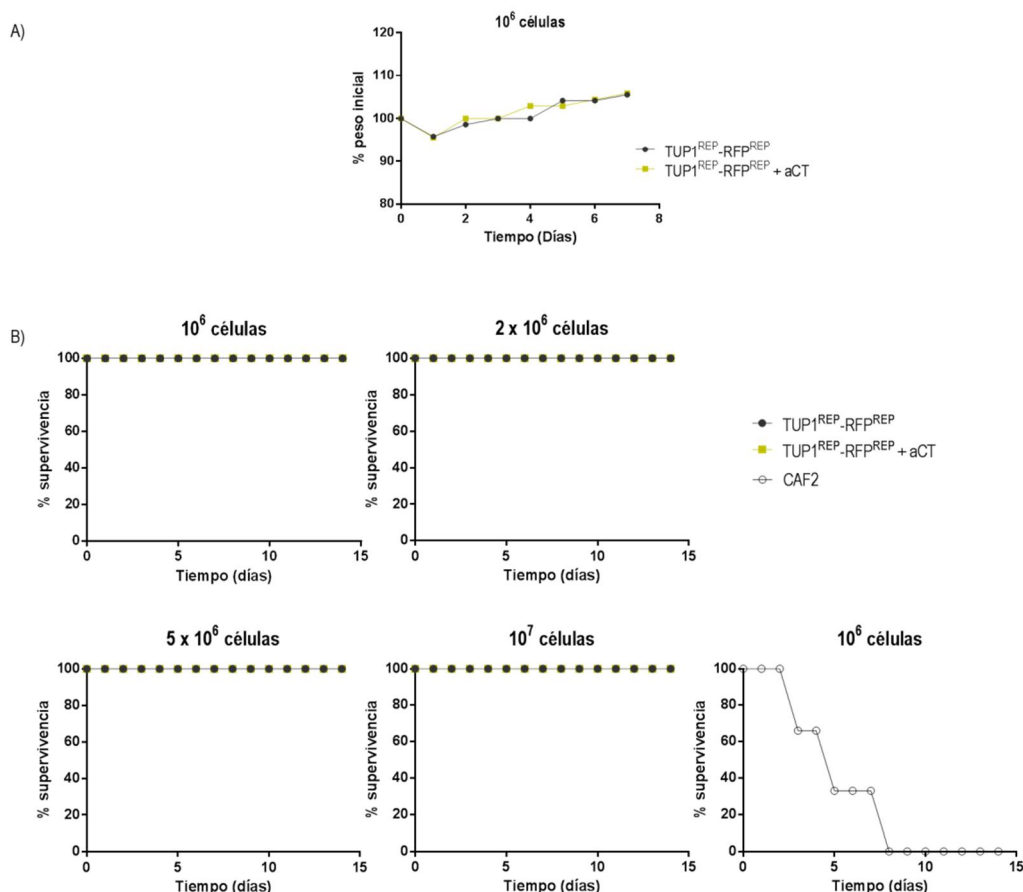
### a) Influencia de la filamentación en el curso de una infección sistémica

Para analizar la influencia de la filamentación en la virulencia del mutante TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, se llevaron a cabo varios ensayos de infección sistémica con dos grupos de ratones, uno de ellos tratado con aCT durante todo el proceso. Se analizaron varias dosis de inóculo de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, analizando también la virulencia de la cepa CAF2 como control.

La infección con 10<sup>6</sup> células de la cepa CAF2 resultó en una inminente pérdida de peso en los ratones (datos no mostrados) y una mortalidad del 100 % de los ratones al cabo de 7 días tras la inyección (Figura 39B). En contraste, la infección con la misma dosis de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> no provocó mortalidad alguna, independientemente de la presencia de aCT en el agua de bebida. Para verificar esta drástica disminución de la virulencia, se realizaron infecciones a mayores dosis (2 x 10<sup>6</sup>, 5 x 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> células); sin embargo, ninguna de ellas resultó ser letal, lo que refleja que dicha cepa es prácticamente avirulenta tanto en presencia como en ausencia del antibiótico (Figura 39B).

La evolución en el peso de los ratones infectados con una dosis de 10<sup>6</sup> células fue controlada durante los días siguientes a la inyección. Independientemente de la presencia o no de aCT en el agua de bebida, los ratones infectados con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> no mostraron pérdida significativa de peso. A pesar de disminuir ligeramente 24 horas tras la infección, los valores de peso se estabilizaron y aumentaron de manera natural en ambos grupos, que presentaban datos similares entre ellos (Figura 39A). Una evolución similar se observó en el peso del resto de los ratones infectados con las distintas dosis antes comenadas (datos no mostrados).





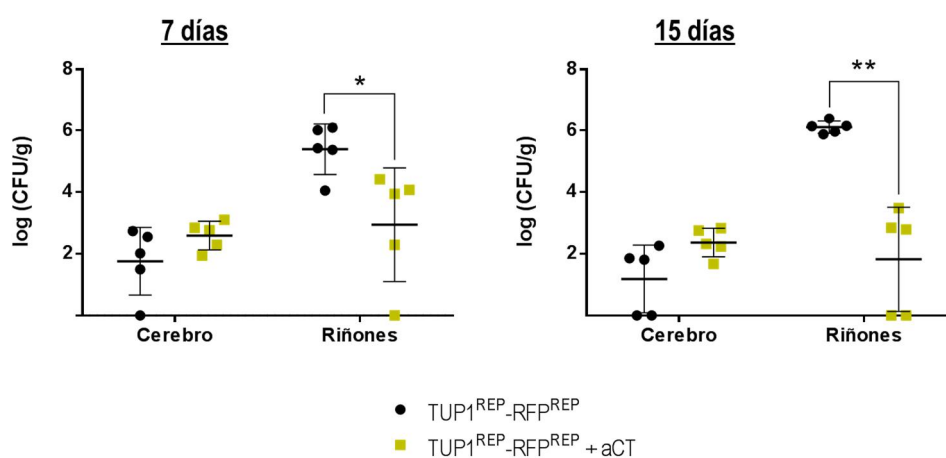
**Figura 39. Virulencia de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>**

Ensayos de virulencia de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a través de una infección sistémica en un grupo control y un grupo tratado con aCT a 1 mg/mL en el agua de bebida y desde 3 días previos al inicio. A) Evolución del peso de los animales tras ser infectados en función de su peso inicial. B) Porcentajes de supervivencia de los ratones infectados con las dosis indicadas de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, en relación a la mortalidad correspondiente a una infección de 10<sup>6</sup> células de la cepa silvestre CAF2.

Durante estas infecciones sistémicas cuantificamos la presencia del hongo en los órganos diana (en los que previamente se había detectado la presencia de la aCT), a dos tiempos diferentes en el transcurso de la infección. Tras 7 días desde la inoculación, se cuantificaron los alojamientos en cerebro y riñones de la mitad de los individuos de cada grupo. Tanto el grupo control como aquel tratado con aCT presentaban alojamientos similares en cerebro (alrededor de 10<sup>2</sup> CFUs/g de órgano). Sin embargo, sí se observaron cambios significativos en el caso de los riñones, siendo de 5,4 (aproximadamente 10<sup>6</sup> CFUs/g) en el grupo sin tratar y de 2,9 (10<sup>3</sup> CFUs/g) en el tratado con aCT (Figura 40).

Estas diferencias fueron aun más significativas tras 15 días en el curso de la infección, el alojamiento detectado en los riñones se incrementó en todos los ratones sin antibiótico, mostrando un valor medio de 6,13 (10<sup>6</sup> CFUs/g). En cambio, en el grupo tratado con aCT la cantidad del hongo disminuyó hasta 10<sup>2</sup> CFUs/g, e incluso algunos ratones no se detecta alojamiento alguno (Figura 40). Estos datos sugieren una menor capacidad de

invasión de la forma filamentosa de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, ya que el alojamiento en riñones se ve significativamente reducido.



**Figura 40. Alojamiento en órganos de ratones infectados con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>**

Valores logarítmicos de unidades formadoras de colonia (CFU) por gramo de órganos obtenidos de dos grupos de ratones (N=5) infectados con una dosis de 10<sup>6</sup> células de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>. La administración de aCT a 1 mg/mL en el agua de bebida se inició 3 días previos a la infección del grupo tratado y se mantuvo durante los 15 días de ensayo. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Todos estos datos nos sugieren que la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> muestra una virulencia atenuada tanto en presencia como en ausencia del antibiótico, y parecen dar lugar a una infección crónica y no letal. La inducción del crecimiento filamentoso por represión de *TUP1* disminuye significativamente la cantidad del hongo presente en riñones, los principales órganos a los que *C. albicans* se dirige durante este proceso.



### 3. Estudio de la respuesta humoral frente a *Candida albicans* en modelos de colonización e infección

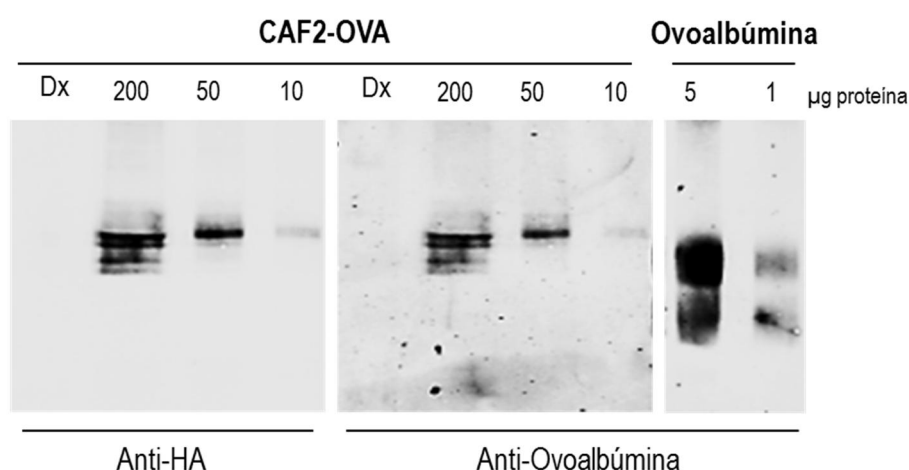
Hasta la fecha la importancia de la respuesta inmunitaria de tipo celular en el control de la infección fúngica se ha descrito en numerosos trabajos (Cheng *et al.*, 2012), mientras que la función que desempeñan los anticuerpos aún genera cierta controversia (Casadevall *et al.*, 2002; Cassone *et al.*, 2005; Polonelli *et al.*, 2000). Recientemente, se ha descrito la importancia de la respuesta inmunitaria humoral en la resolución de las candidiasis, así como la posible utilidad de los anticuerpos en el tratamiento de dichas infecciones (Cabezas *et al.*, 2010). En modelos murinos, se ha descrito la eficiencia de ciertos anticuerpos en el tratamiento de una infección sistémica (Brena *et al.*, 2007; Magliani, Conti, De, *et al.*, 1997; Sevilla *et al.*, 2006).

En nuestro departamento se ha caracterizado el patrón de anticuerpos generados frente a una candidiasis sistémica en el modelo de ratón así como su posible papel protector (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004a, 2004b). Sin embargo, no existían datos en el inicio de este trabajo del tipo de respuesta humoral que se origina en el hospedador frente a una situación de comensalismo. Nos planteamos, pues, conocer el perfil de anticuerpos generados en el modelo de colonización descrito.

#### A. Obtención de una cepa de *Candida albicans* (CAF2-OVA) que expresa un antígeno modelo

Para llevar a cabo el estudio de la respuesta humoral frente a la interacción con *C. albicans*, consideramos interesante utilizar la expresión de un antígeno modelo con el objetivo de aumentar la versatilidad y especificidad del sistema, de forma que se pudiera analizar la respuesta antígeno-dependiente. Para ello empleamos una cepa silvestre de *C. albicans* (CAF2) que además expresa un antígeno modelo como es la ovoalbúmina de pollo (OVA). La secuencia de ADN de este gen fue adaptada en su utilización de codones a *C. albicans* y se añadió además una etiqueta proteica (el epítipo HA) para facilitar su inmunodetección. Su secuencia fue incorporada al genoma de la cepa silvestre CAF2 y bajo la regulación negativa por tetraciclina (sistema TET-OFF) generando la cepa CAF2-OVA, capaz de producir la proteína OVA epitopada con HA en ausencia de tetraciclina.

La producción *in vitro* de ovoalbúmina fue confirmada por *western blot* usando los anticuerpos anti-HA y anti-ovoalbúmina. También se determinó su represión en presencia de doxiciclina y su tamaño aproximado al de la ovoalbúmina pura (45 kDa) (Figura 41).



**Figura 41. Producción de ovoalbúmina en la cepa CAF2-OVA**

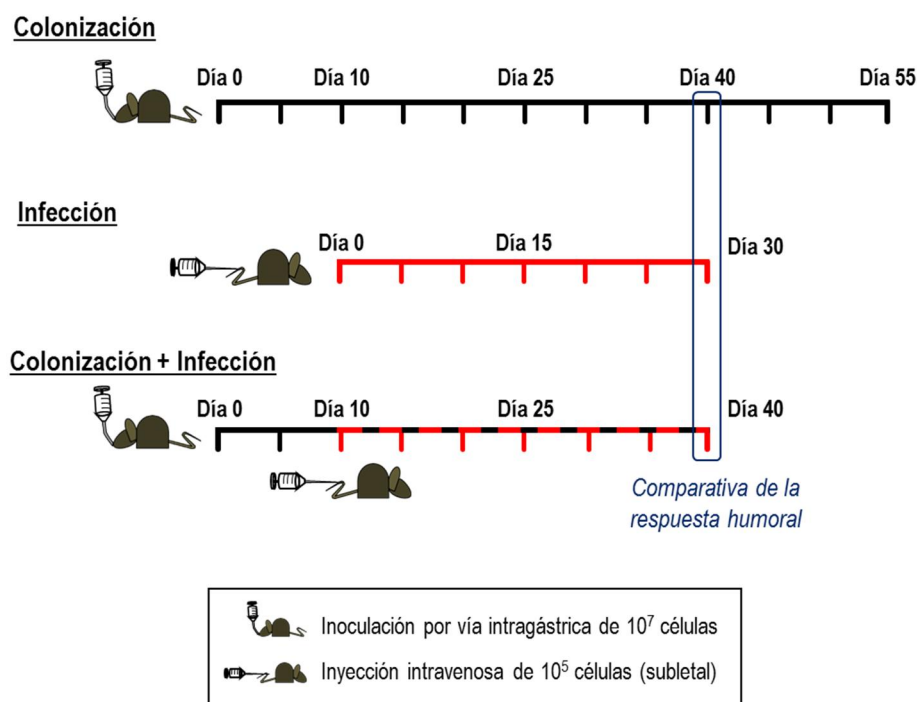
Se muestra la detección de la ovoalbúmina en diferentes cantidades (200, 50 y 10 µg) de un extracto proteico total de la cepa CAF2-OVA, obtenido en fase estacionaria del crecimiento en medio YPD a 37 °C. La detección se realiza tanto con un anticuerpo que reconoce a la propia proteína (anti-ovoalbúmina) como uno que reconoce el epítipo al que está fusionada (anti-HA). Los carriles Dx contienen 200 µg de extracto proteico de la misma cepa incubada con doxiciclina a 20 µg/mL. A la derecha se encuentra como control positivo la detección de 5 y 1 µg de ovoalbúmina pura.

## B. Caracterización de los diferentes modelos murinos

En estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha utilizado la inmunoproteómica para definir en *C. albicans* proteínas inmunogénicas mediante el análisis del patrón de anticuerpos que genera el hongo en una infección sistémica (Pitarch *et al.*, 2011, 2014). Se han utilizado modelos de ratón previamente caracterizados por nuestro grupo de investigación, como son la colonización gastrointestinal (Prieto *et al.*, 2014), y una infección sistémica subletal (Pitarch *et al.*, 2001). En esta tesis doctoral hemos desarrollado un nuevo modelo en el que los ratones son colonizados y, posteriormente infectados con una dosis subletal del hongo (ensayo al que nos referiremos en ocasiones como “C+I”). Hemos utilizado en todos los modelos la cepa portadora del antígeno OVA y tras el análisis de la respuesta serológica (SERPA) hemos podido detectar diferentes perfiles de la respuesta de anticuerpos generada en cada uno de los tres modelos experimentales utilizados.

En la Figura 42 se muestra el esquema detallado de los tres modelos de ratón, donde se describen los tiempos y tipo de inóculo utilizado. Durante cada ensayo, se tomaron muestras de sangre en los puntos del tiempo señalados en la figura para más tarde analizar la evolución de la respuesta de anticuerpos a lo largo del tiempo mediante técnicas proteómicas. En cada uno de los experimentos se anotaron los pesos de todos

los ratones, así como se tomaron las muestras necesarias para confirmar la presencia de *C. albicans* en el hospedador: muestras de heces durante la colonización y órganos diana durante la infección sistémica.



**Figura 42. Esquema detallado de los modelos desarrollados**

Descripción de los tres experimentos llevados a cabo: colonización gastrointestinal (señalado en negro), infección sistémica (en rojo) y colonización e infección (en ambos colores), así como la duración de cada uno de ellos. Con el objetivo de establecer una correcta comparación, el día 0 comienza la colonización en los dos grupos correspondientes, mientras que la infección subletal se realiza a día 10. En cada ensayo se toman las muestras necesarias (heces, órganos o ambos), se anota el peso de todos los individuos del grupo y se recoge suero en los días indicados, que más tarde será empleado para la identificación de anticuerpos.

#### a) Modelo de colonización intestinal

El experimento de colonización intestinal se llevó a cabo durante un total de 55 días, de forma similar al descrito anteriormente y elaborado por nuestro grupo de investigación (Prieto *et al.*, 2014). La larga duración de este experimento tuvo como objetivo definir y describir dos etapas: colonización temprana (aproximadamente 10 días) y colonización tardía (aproximadamente 55 días). El tratamiento antibiótico se inició 3 días previos al comienzo de la colonización, momento en el que se inocularon  $10^7$  células de la cepa CAF2-OVA. La toma periódica de heces permitió el seguimiento del nivel de colonización (Figura 43B).

### b) Modelo de infección sistémica

El modelo de candidiasis diseminada en ratón ha demostrado ser una herramienta muy valiosa para el estudio de la respuesta humoral, debido a su semejanza con el ser humano. En este modelo la dosis empleada para la infección subletal es de  $10^5$  células con el objetivo de generar una infección crónica que mantenga a los animales infectados pero en un estado saludable. Esta dosis se inoculó mediante una inyección intravenosa en la vena lateral de la cola y tras 15 días se analizó el alojamiento fúngico en riñones, bazo y ganglios mesentéricos (Figura 43C).

### c) Modelo de colonización seguida de infección sistémica

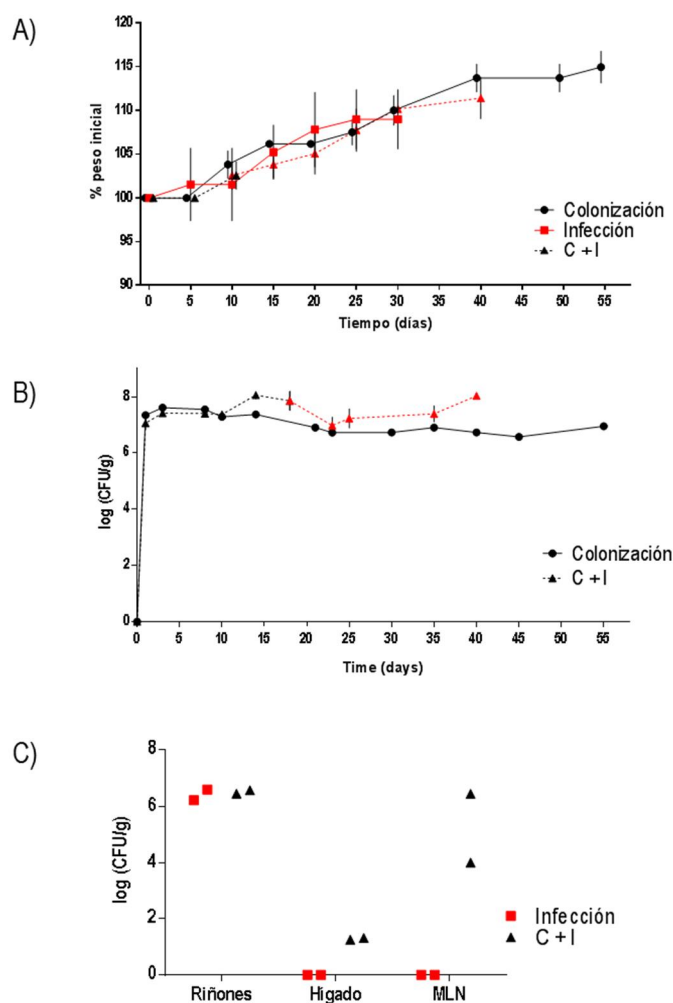
La tercera aproximación experimental llevada a cabo consistió en analizar la respuesta generada frente a una infección sistémica en ratones previamente colonizados, hasta la fecha los modelos descritos en la bibliografía necesitan que los ratones colonizados sean sometidos a tratamientos inmunosupresores para favorecer la diseminación sistémica (Koh, 2013). Como el objetivo del trabajo era el análisis de la respuesta humoral, evitamos los tratamientos inmunosupresores posteriores a la colonización y que fueron sustituidos por una infección sistémica. Para ello, los ratones fueron colonizados en las mismas condiciones que en el primer experimento descrito, inoculando  $10^7$  células tras un tratamiento antibiótico previo. Una vez confirmado el establecimiento de la colonización, se realizó una infección sistémica subletal ( $10^5$  células). Tras 15 días desde el inicio de esta infección, se analizó el alojamiento fúngico en órganos diana (Figura 43C). El seguimiento de la colonización mediante la toma periódica de heces se mantuvo durante todo el experimento (Figura 43A).

Para establecer una comparación correcta entre el ensayo de colonización y el ensayo C+I, consideramos la inoculación intragástrica como inicio del experimento en ambos casos. De la misma manera, para comparar el ensayo de infección con el ensayo C+I el inicio de ambos experimentos fue la inoculación intravenosa. A lo largo de cada ensayo se controló el peso de los ratones como principal señal de su estado de salud. El peso de todos los ratones evolucionó de manera normal en el tiempo en los tres modelos empleados, mostrando únicamente los ratones infectados una ligera y no significativa disminución en su peso (Figura 43A).

El seguimiento de la colonización fue realizado en los grupos correspondientes (colonización y C+I), mostrando ambos un correcto establecimiento de la colonización. Los valores oscilan alrededor de  $10^7$  CFUs/g no sólo en el ensayo de colonización, sino también en el grupo C+I durante los 40 días totales analizados, por lo que la infección sistémica subletal no parece afectar al establecimiento de la cepa en el intestino (Figura 43B).

Los alojamientos en riñones detectados tras 15 días de infección subletal muestran valores de aproximadamente  $10^6$  CFUs/g en ambos grupos, datos similares a los obtenidos anteriormente en condiciones similares (Diez-Orejas *et al.*, 1997). No se detectó

la presencia del hongo ni en hígado ni en ganglios mesentéricos de ratones infectados, sin embargo aquellos que habían sido colonizados previamente mostraron alojamientos de  $10^4$ - $10^6$  CFUs/g respectivamente (Figura 43C).



**Figura 43. Parámetros analizados en los ensayos de colonización (C), infección (I) y colonización seguida de infección (C + I)**

A) Evolución en el peso de los grupos de ratones indicados. Los valores se calcularon en función del peso inicial. Los símbolos en rojo indican el inicio de la infección sistémica subletal en ratones colonizados (grupo C+I). B) Nivel de colonización de los grupos indicados expresados en valores logarítmicos de CFUs/g de heces, tomadas cada 2-3 días durante ambos ensayos. Al igual que en el gráfico anterior, la línea roja simboliza la presencia de la infección en el grupo C+I. C) Alojamiento en órganos durante la infección sistémica subletal en los grupos indicados. Los órganos fueron extraídos y analizados tras 15 días de infección.

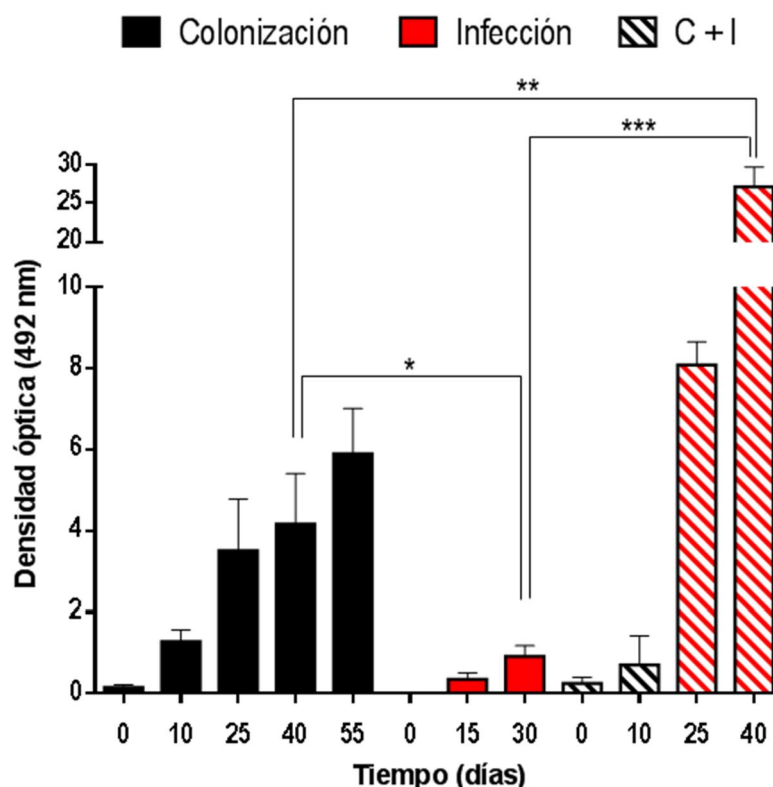
#### d) Cuantificación de la respuesta humoral

La titulación de los sueros obtenidos para la cuantificación de la respuesta humoral fue llevada a cabo por el método ELISA. Como se describe en el esquema de la Figura 42, en

los tres tipos de experimentos se tomaron muestras de suero de todos los individuos del grupo y a distintos tiempos dependiendo del modelo (0, 10, 25, 40 y 55 días). Así mismo, se obtuvo suero procedente de ratones sin ningún tipo de tratamiento o interacción con *C. albicans*, para su empleo como control negativo. Cada muestra analizada contenía la mezcla de sueros obtenidos de los diferentes ratones, en un punto del tiempo en cada ensayo. Se determinaron los títulos de IgG total de los sueros correspondientes a cada ensayo, así como su evolución en el tiempo.

Los títulos de anticuerpos aumentaban en el tiempo en cada uno de los modelos empleados, tal y como se refleja en la Figura 44. En colonización el título de IgG total incrementó progresivamente a lo largo del tiempo, mostrando al cabo de 55 días un valor de aproximadamente 6 unidades de densidad óptica. Por el contrario, el título mostrado durante la infección sistémica subletal fue notablemente bajo: 0,5 unidades de densidad óptica tras 15 días y aproximadamente 1 al cabo de 30 días. Finalmente, en el modelo de C+I se detectaron títulos bajos en la fase temprana de la colonización (similares a los obtenidos en el primer modelo). Sin embargo, el inicio de la infección sobre estos ratones colonizados provocó un incremento muy significativo del título en los días posteriores, mostrando valores de densidad óptica de aproximadamente 8 tras 15 días y de alrededor de 25 tras 30 días de infección.

Los niveles de anticuerpos anti-*Candida* más altos se observaron en el ensayo C+I, siendo significativamente superiores a los detectados en los modelos de colonización e infección. Comparando el título de anticuerpos en los días señalados en la Figura 42, observamos que las diferencias son todas ellas significativas. El título de C+I ( $27,1 \pm 1,8$ ) es 5 veces mayor que su equivalente en colonización ( $4,1 \pm 0,8$ ) y 30 veces mayor que el generado en infección sistémica ( $0,92 \pm 0,15$ ), grupo que mostró los títulos de anticuerpos más bajos (Figura 46).



**Figura 44. Titulación de sueros por ELISA**

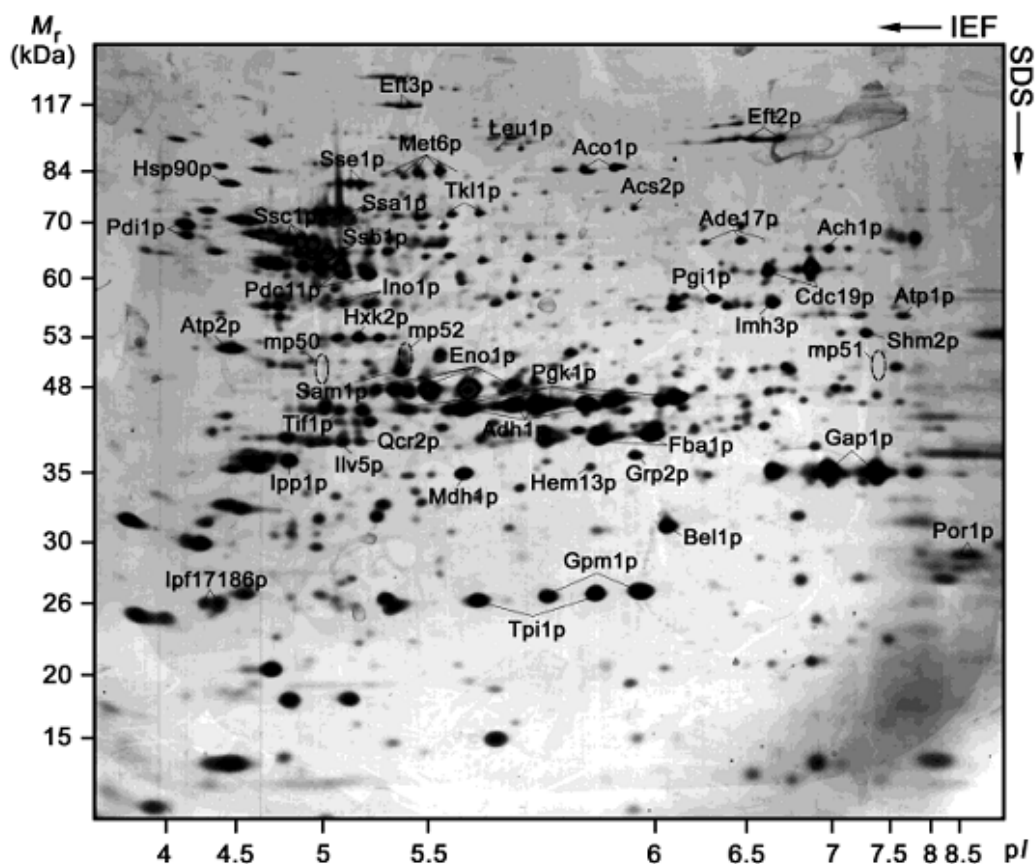
Títulos de anticuerpos generados frente a una colonización, a una infección sistémica y a una colonización seguida de una infección. Se muestran los valores de densidad óptica a una longitud de onda de 492 nm correspondientes a los sueros policlonales extraídos a diferentes tiempos de los tres ensayos realizados. En cada columna se representa la media y el error estándar de la media. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ .

Los títulos de anticuerpos nos confirman que la respuesta humoral frente a *C. albicans* es significativamente más alta al producirse una infección sistémica en un ratón previamente colonizado. Además, se observa con claridad que la respuesta generada frente a la colonización es también significativamente mayor que la generada al producirse una infección sistémica con una dosis subletal.

### C. Análisis inmunoproteómico de la respuesta humoral

Con objeto de identificar la respuesta de anticuerpos en los tres modelos descritos anteriormente, procedimos a analizar la composición de los diferentes sueros obtenidos según se detalla en la Figura 45. El análisis de los sueros se realizó mediante SERPA (2DE seguido de *western blot*) tal y como se detalla en Materiales y Métodos. En cada uno de los experimentos se utilizó su correspondiente gel 2DE para identificar las manchas que aparecen en el *western blot*. En cada gel, la identificación de las proteínas se realizó por comparación con un mapa de referencia de proteínas de *C. albicans* (Figura 45)

generado en nuestro departamento y disponible en la base de datos “Compluyeast 2D-PAGE Database” (Pitarch *et al.*, 2004).

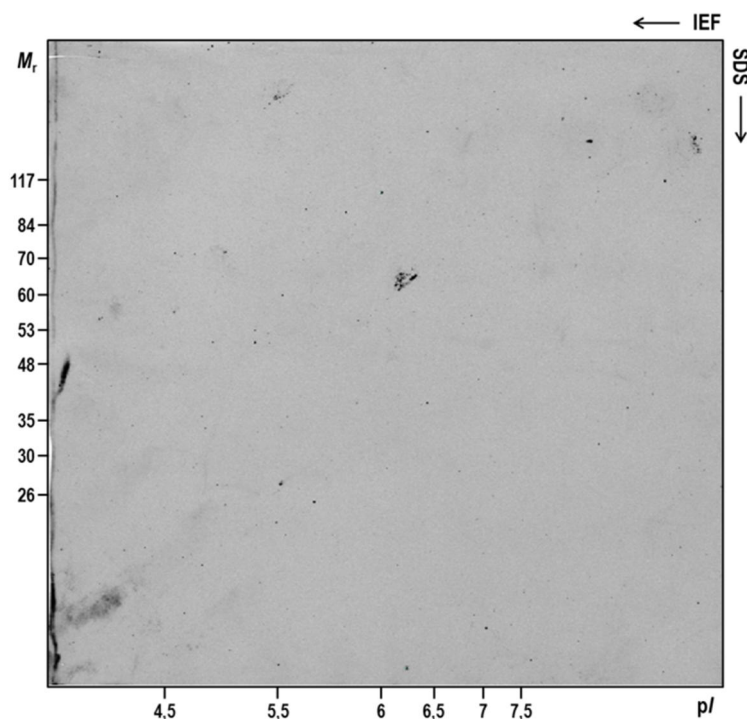


**Figura 45. Mapa 2DE de proteínas citoplasmáticas de *C.albicans***

Mapa bidimensional de proteínas inmunogénicas de *C. albicans* que estimulan el sistema inmunitario durante la candidiasis. Este mapa de proteínas (Pitarch *et al.*, 2004) fue tomado como referencia para la identificación de proteínas en este trabajo.

El primer suero analizado fue obtenido de ratones sin interacción de ningún tipo con *C. albicans*. Como se muestra en la Figura 46, el suero no contiene niveles detectables de anticuerpos anti-*Candida*.



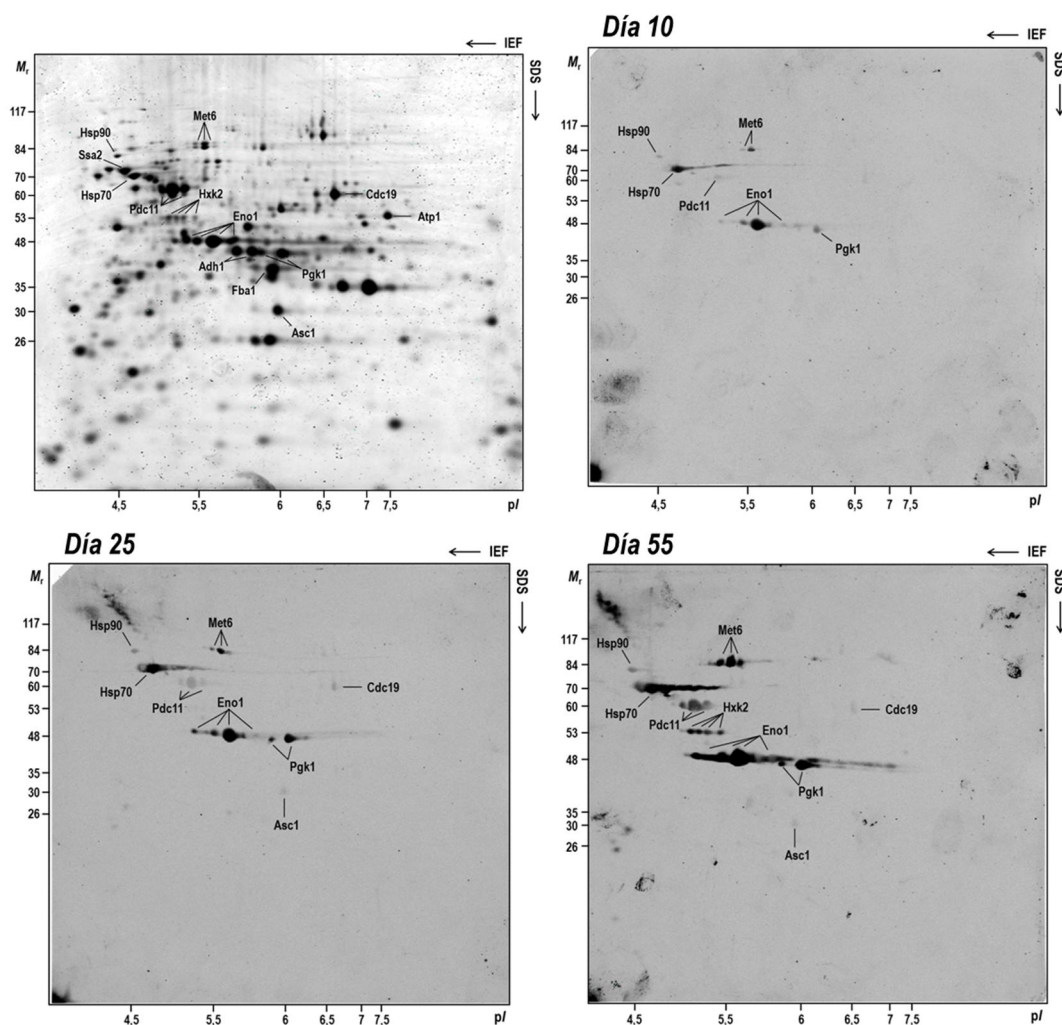


**Figura 46. Detección de proteínas inmunogénicas en ratones control**

La hibridación de la membrana se realizó con suero policlonal extraído de ratones control antes de ser tratados.

#### a) Patrón de anticuerpos en el modelo de colonización intestinal

Como se refleja en la Figura 42, a lo largo de la colonización, se obtuvieron muestras de suero que fueron analizadas para comparar la respuesta humoral en una etapa temprana del proceso (10 días) y más tardía (55 días). Los patrones de anticuerpos detectados a lo largo de la colonización se muestran en los WB de la Figura 47. Al comparar las manchas proteicas obtenidas con el correspondiente gel 2DE, nos permitió identificar las diferentes proteínas inmunogénicas detectadas en cada uno de los sueros y señaladas en cada uno de los WB.



**Figura 47. Detección temprana de proteínas inmunogénicas durante la colonización por *C. albicans***

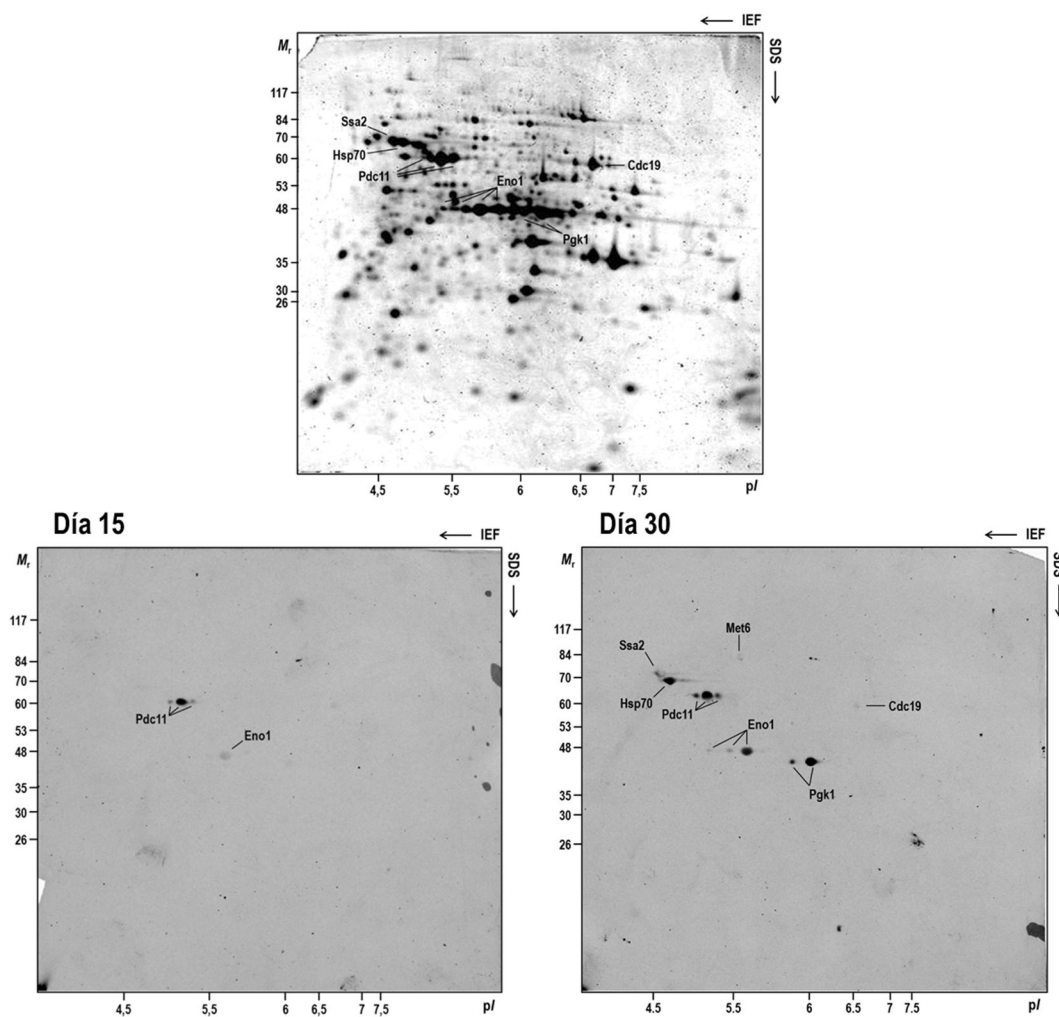
Se muestra la detección de anticuerpos en diferentes puntos en el transcurso de una colonización intestinal. En cada caso se indican las proteínas detectadas. En cada imagen se encuentra el marcador de pesos moleculares a la izquierda ( $M_r$ ) y el marcador de puntos isoeléctricos (pI) abajo.

Durante los primeros 10 días de colonización, los sueros muestran una señal baja de anticuerpos que reconocen proteínas como la Hsp90 (Heat Shock Protein 90), Pdc11 (piruvato descarboxilasa), Pgk1 (fosfoglicerato quinasa) y Met6 (metionina sintasa), mientras que la intensidad mostrada para la Eno1 (enolasa) es bastante alta, al igual que para la proteína Hsp70. Al cabo de 25 días de colonización, el título de anticuerpos frente a las proteínas anteriores incrementa pero además se detectan nuevos anticuerpos frente a las proteínas Cdc19 (piruvato quinasa) y Asc1 (proteína de la subunidad 40S del ribosoma). Finalmente, en la etapa tardía de colonización (55 días) se observa un mayor nivel general de anticuerpos, algo que esperábamos por los resultados de la titulación por ELISA. Además de este incremento en el título de los anticuerpos frente a las proteínas

señaladas en los anteriores tiempos, se detectan nuevos anticuerpos frente a la proteína Hxk2 (hexoquinasa).

### b) Patrón de anticuerpos en el modelo de infección sistémica

Los patrones de anticuerpos detectados a lo largo de la infección subletal se muestran en la Figura 48. Al comparar las manchas obtenidas en los *western blot* con el correspondiente gel 2DE, identificamos las diferentes proteínas inmunogénicas detectadas en cada uno de los sueros, tal y como se indican en la figura.



**Figura 48. Detección de proteínas inmunogénicas durante la infección por *C. albicans***

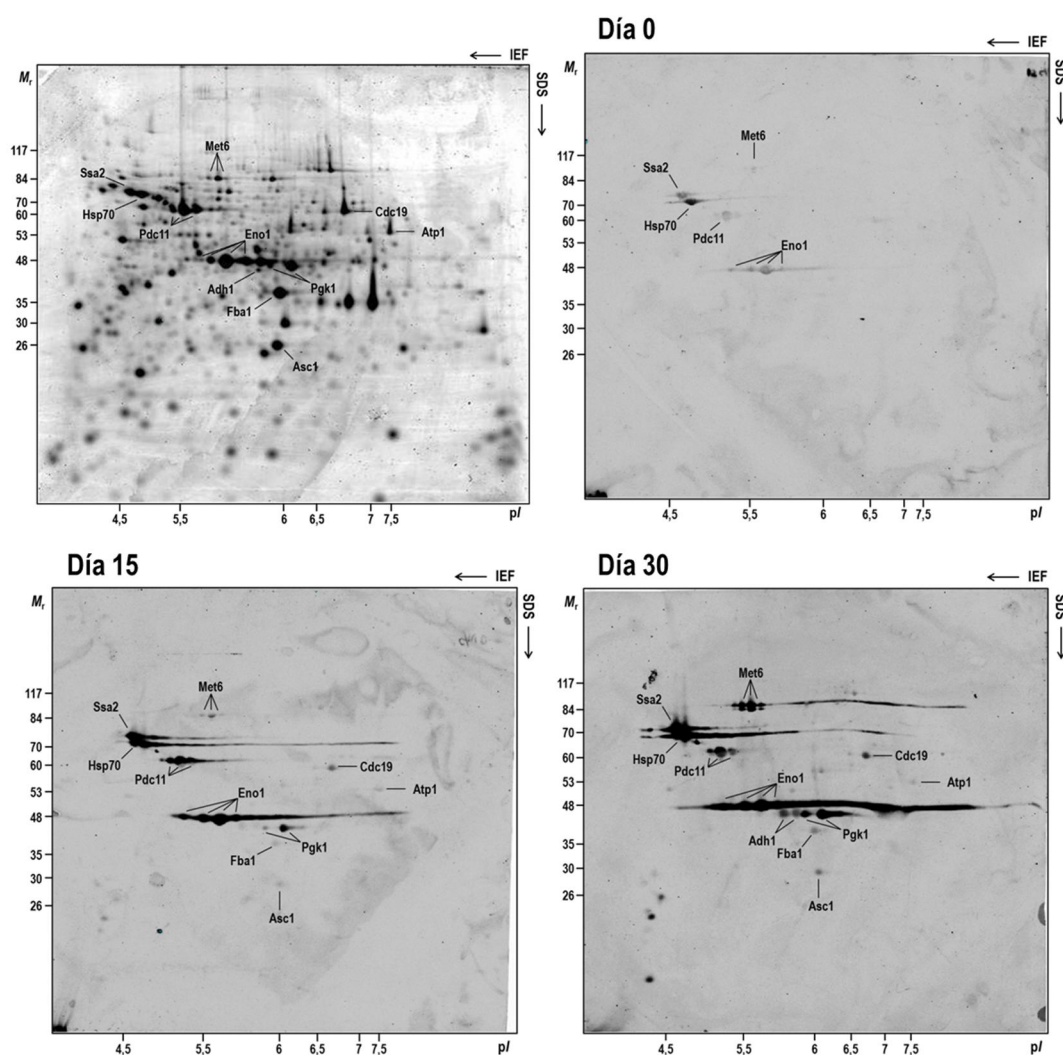
Detección a 15 y 30 días respectivamente en el transcurso de la infección sistémica subletal. Se muestran las proteínas detectadas, así como los marcadores de pesos moleculares ( $M_r$ ) y puntos isoeléctricos ( $pI$ ).

Se observa un título muy bajo de anticuerpos a lo largo de la infección, tal y como esperábamos teniendo en cuenta sus correspondientes valores en el ELISA. Tras 15 días

únicamente se detectan anticuerpos frente a las proteínas Pdc11 y Eno1. Al cabo de 30 días de infección aumenta ligeramente el título de ambos anticuerpos y además se detectan nuevos correspondientes a las proteínas Hsp70, Cdc19, Met6 y Pgk1.

### c) Patrón de anticuerpos en el modelo de colonización intestinal + infección sistémica

En el caso de una infección sistémica en ratones previamente colonizados, las muestras de suero se extrajeron tras 10 días de colonización (momento previo a la infección y señalado como día 0) y tras 15 y 30 días en el transcurso de la misma. Al comparar las manchas obtenidas con el correspondiente gel 2DE, identificamos las diferentes proteínas detectadas por cada uno de los sueros, como se muestra en la Figura 49. Los sueros procedentes de ratones sólo colonizados (día 0) tienen una concentración menor de anticuerpos que los infectados posteriormente (días 15 y 30).



**Figura 49. Detección de proteínas inmunogénicas durante una colonización seguida de una infección sistémica**

Patrón de anticuerpos expresados a día 0, correspondiente al inicio de la infección, y a 15 y 30 días en el transcurso de la misma. Los ratones fueron previamente colonizados durante 10 días antes de proceder a la infección. Se muestran las proteínas detectadas, así como los marcadores de pesos moleculares (Mr) y puntos isoeléctricos (pI).

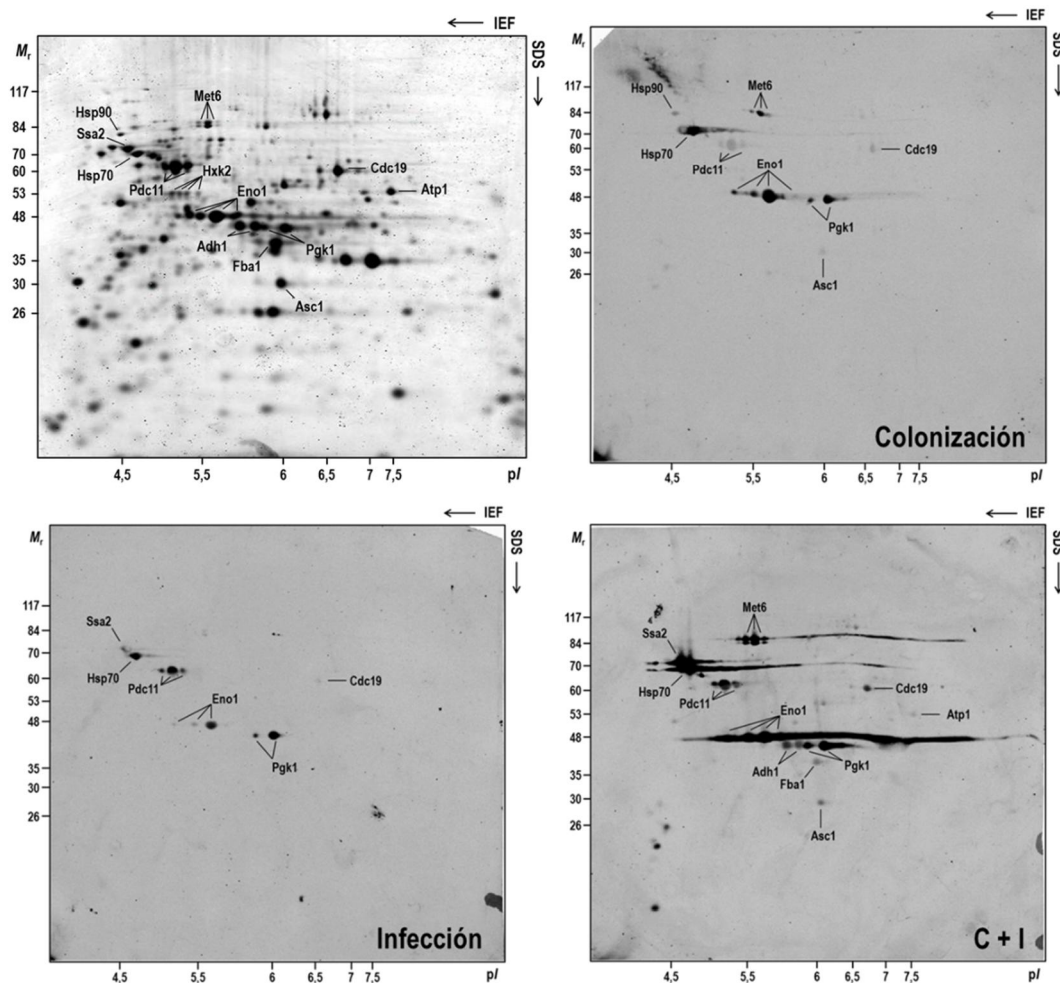
La inmunodetección de los sueros correspondiente al momento previo a la infección (día 0) muestra anticuerpos frente a las proteínas Eno1, Pdc11, Met6, Hsp70 y Ssa2, siendo la concentración que aparece pequeña y no destacable para ningún anticuerpo. Tras los 15 primeros días de infección, se puede observar un aumento notable de los anticuerpos detectados antes de la inyección y aparecen nuevos anticuerpos frente a Cdc19, Pgk1, Asc1, Fba1 y Atp1 (subunidad  $\alpha$  de la ATPasa). Al cabo de 30 días del transcurso de dicha infección, observamos la presencia del mismo patrón de anticuerpos que en el tiempo anterior, pero con un título significativamente mayor. En esta última detección también se aprecia la presencia de anticuerpos frente a Adh1 (alcohol deshidrogenasa).

En este modelo de C+I, el patrón de anticuerpos detectados en los sueros son significativamente mayores tanto cualitativa como cuantitativamente, comparado con los modelos individuales de colonización e infección. Estos datos se correlacionan con los valores anteriormente obtenidos en el ELISA de la Figura 44. Hemos descrito por primera vez, la composición de la respuesta de anticuerpos en un modelo de colonización intestinal seguido de infección con el hongo *Candida albicans*.

#### d) Análisis comparativo del patrón de anticuerpos en los diferentes modelos

Con el objetivo de establecer la comparación más adecuada de los tres tipos de respuesta humoral obtenidos y tal y como se indica en la Figura 44, se realizó el análisis por WB de los sueros del día 40 para los ensayos de colonización y C+I y del día 30 para el ensayo de infección subletal sistémica (Figura 50). Una vez más la identificación de las manchas detectadas se realizó utilizando el respectivo mapa de 2D de referencia.





**Figura 50. Comparativa de patrones de anticuerpos obtenidos en los tres modelos**

Patrones de anticuerpos en los sueros obtenidos a día 30 en el transcurso de la colonización, la infección sistémica y ambas en el ensayo C+I. Se muestran las proteínas detectadas, así como los marcadores de pesos moleculares ( $M_r$ ) y puntos isoeléctricos ( $pI$ ).

Los patrones correspondientes a los sueros de colonización y a la infección sistémica presentan en común la presencia de anticuerpos frente a las proteínas Hsp70, Cdc19, Pcd11, Pgk1 y Eno1, siendo la concentración ligeramente mayor en el caso del modelo de colonización. Por otro lado, observamos anticuerpos exclusivos del modelo de colonización (Hsp90 y Met6) así como del modelo de infección (Ssa2).

El patrón detectado en el suero de los ratones procedentes del modelo C+I contiene los anticuerpos observados en los dos modelos anteriores, pero mostrando una concentración significativamente mayor, además de presentar anticuerpos específicos frente a una nueva proteína: Adh1. Así, en estos sueros se han detectado anticuerpos frente a todas las proteínas ya descritas: Hsp70, Cdc19, Pcd11, Pgk1, Eno1, Met6, Ssa2, Asc1, Fba1 y Atp1. Es de resaltar la ausencia de anticuerpos frente a la Hsp90, que se detectaba

inicialmente (día 0) y la ausencia de la Hxk2, que aparecía exclusivamente a tiempos largos de colonización.

En resumen, hemos definido un patrón diferencial de anticuerpos en los sueros de los ratones colonizados, infectados y C+I y, además, la cantidad de anticuerpos presentes en estos ratones concuerda con su correspondiente título obtenido anteriormente mediante ELISA. Como síntesis de todos estos resultados, en la tabla 1 se muestran las proteínas inmunogénicas detectadas en cada modelo. Se detalla así mismo el día en el que cada suero fue analizado, así como la intensidad de las proteínas detectadas. En la tabla también aparecen en gris los resultados correspondientes a los días en los que se ha establecido el análisis comparativo de los sueros procedentes de los diferentes modelos.

Como se aprecia en la Tabla 1, los anticuerpos mayoritarios son frente a la enolasa, que se puede considerar una proteína inmunodominante, estos anticuerpos aparecen en todos los sueros estudiados (incluso en los procedentes de colonizaciones e infecciones tempranas) con una intensidad de señal muy elevada. Los anticuerpos frente a la piruvato descarboxilasa aparecen también en el suero de todos los ratones pero la concentración relativa es comparativamente menor a los anteriormente descritos.

Los anticuerpos frente a la Hsp70, como frente a la Eno1, tienen también una concentración elevada en prácticamente todos los sueros; en este caso es de resaltar que sólo en el caso de tiempos cortos del modelo de infección, los niveles de anticuerpos son indetectables. Un caso similar aparece con la proteína fosfoglicerato quinasa, en este caso los niveles de anticuerpos son menores que los detectados frente a la Hsp70, siendo también indetectables a tiempos cortos del modelo de infección.

Es importante resaltar el papel de los anticuerpos frente a la metionina sintasa, cuyos anticuerpos se detectan en niveles elevados en los sueros de ratones colonizados, y están claramente ausentes en el modelo de infección. Más aún, en el modelo de C+I, la concentración de los anticuerpos anti-Met6 es menor comparándola con el modelo de ratones sólo colonizados. Estos resultados parecen señalar que como consecuencia de la infección, en los ratones colonizados los anticuerpos frente a la Met6 disminuyen.

Hemos revelado la presencia de anticuerpos frente a la proteína hexoquinasa2 que aparecen exclusivamente en el modelo de colonización pero únicamente a tiempos muy largos. De la misma forma, solo en el modelo de C+I hemos detectado anticuerpos frente a una proteína que pertenece a la familia de las *Heat Shock*, la Ssa4.

Proteína	Descripción	Nº acceso CGD	Colonización					Colonización + Infección					Infección		
			0	10	25	40	55	0	10	25	40	0	15	30	
Eno1	Enolasa I	C1_08500C	-	++	+++	+++	++++	-	+	+++	+++++	-	+	++	
Pgk1	Fosfoglicerato quinasa	C6_00750C	-	+/-	++	++	++	-	-	++	+++	-	-	++	
Cdc19	Piruvato quinasa	C2_05460W	-	+/-	+	+/-	+	-	+/-	++	+	-	-	+/-	
Fba1	Fructosa bifosfato aldolasa	C4_01750C	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
Hxk2	Hexoquinasa II	CR_04510W	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
Met6	Metionina sintasa	CR_01620C	-	+	++	++	+++	-	+/-	+	+++	-	-	+/-	
Pdc11	Piruvato descarboxilasa	C4_06570C	-	+/-	++	+/-	++	-	+	+++	++	-	++	+++	
Asc1	Proteína de la subunidad 40S del ribosoma	C7_01250W	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	
Atp1	Subunidad α de ATPasa	C1_04610W	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Adh1	Alcohol deshidrogenasa	C5_05050W	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	
Hsp90	Proteína de choque térmico 90	C7_02030W	-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Hsp70	Proteína de choque térmico 70	C1_13480W	-	++	++	+++	++++	-	+	++	++++	-	-	++	
Ssa2	Proteína de choque térmico de la familia HSP70	C1_04300C	-	-	-	-	-	-	+	++	++++	-	-	+	

**Tabla 1. Patrones de proteínas inmunogénicas en los tres modelos desarrollados**

Proteínas inmunogénicas detectadas en una colonización, una infección sistémica subletal y una colonización seguida de infección. Para cada ensayo se indica el día en que se tomó cada muestra y su intensidad en la inmunodetección: (-) nula, (+/-) muy baja, (+) media, (++) alta y (+++) muy alta.

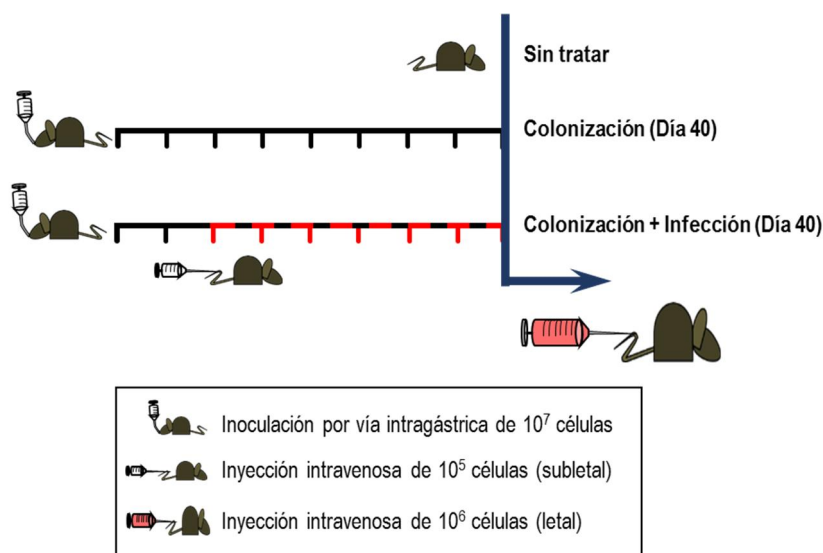


## D. Estudio de la capacidad protectora de la colonización gastrointestinal frente a una infección sistémica letal

Por estudios previos en los que se estudiaba el papel protector de algunos anticuerpos como Hsp90, Fba1 o Met6 (Pachl *et al.*, 2006; Pitarch *et al.*, 2007, 2011; Xin *et al.*, 2011; Xin *et al.*, 2008) e incluso Eno1 (Li *et al.*, 2011; Montagnoli *et al.*, 2004; van Deventer *et al.*, 1996), y dada las diferencias detectadas en el patrón de anticuerpos descritos en los modelos de colonización y C+I, nos planteamos si estos ratones colonizados pudieran estar protegidos frente a una infección posterior por *C. albicans*.

Para ello, llevamos a cabo experimentos similares de colonización y C+I en grupos separados de ratones de igual forma que en el caso anterior. De la misma forma que lo descrito en el apartado anterior y para confirmar tanto la colonización como la infección de los ratones, se tomaron las muestras necesarias en cada caso. La evolución en el peso y los procesamiento de heces y órganos mostraron datos muy similares a los ensayos anteriores (datos no mostrados) y que demuestran la fiabilidad de los modelos descritos.

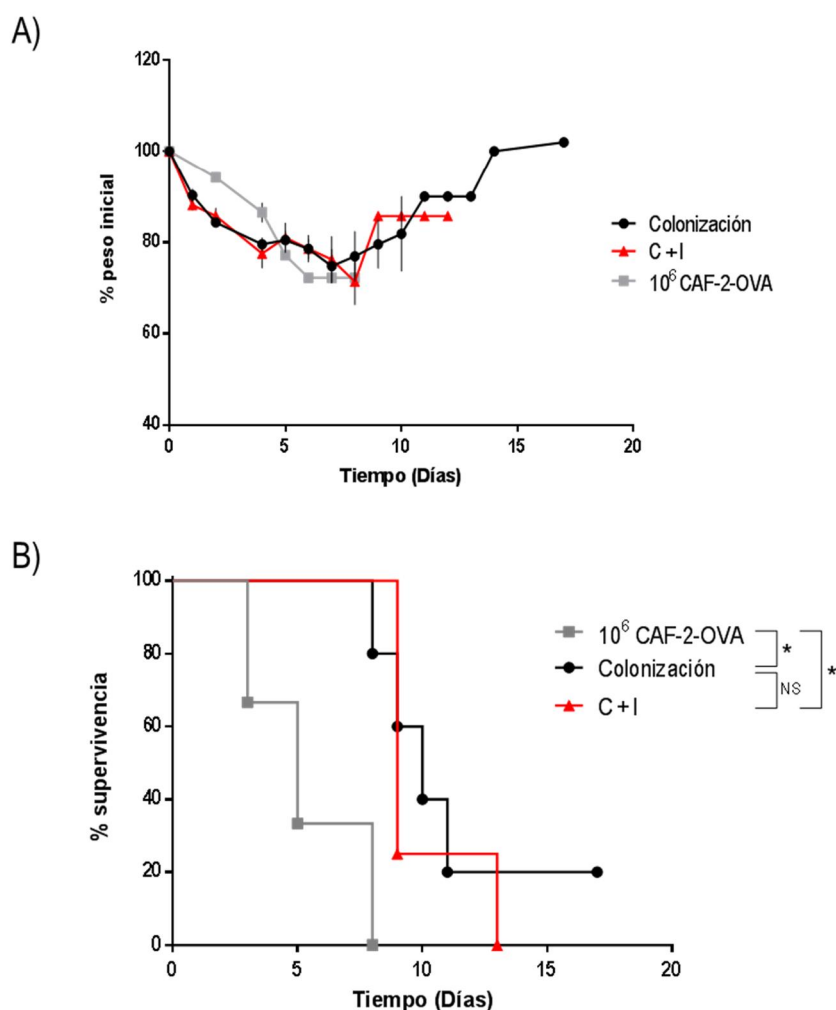
En estos dos grupos de ratones colonizados y C+I, a día 40 y tal y como se detalla en la Figura 51, realizamos una infección sistémica letal, como se describe en materiales y métodos. Aunque esta dosis de  $10^6$  células de la cepa CAF2-OVA se considera letal, un grupo adicional de ratones (sin ningún tipo de tratamiento) fue incluido en este experimento para confirmar la idoneidad del inóculo utilizado.



**Figura 51. Esquema de los ensayos realizados para el estudio de la capacidad de protección de cada modelo**

Descripción experimental para el estudio de la capacidad de protección de los patrones de anticuerpos anteriormente obtenidos. Los ensayos de colonización, infección sistémica subletal y ambas (C+I) se realizaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Al final de cada uno, los ratones son infectados con  $10^6$  células de la misma cepa (dosis letal) para determinar la resistencia que presentan a dicha infección.

Tras la infección letal en los tres grupos de ratones, se midió el peso de todos ellos diariamente, como se refleja en la Figura 52A. En el grupo control de ratones sin colonizar, se observó una drástica y mantenida bajada de peso hasta el final del experimento, reflejando el desarrollo del proceso infeccioso. Por el contrario, los ratones de los grupos de colonización y C+I mostraron una ligera disminución en su peso, sin embargo, después de diez días todos los ratones recuperaron su peso inicial y lo mantuvieron a lo largo del experimento.



**Figura 52. Resistencia de ratones pre tratados con *C. albicans* a una infección letal**

A) Evolución del peso tras una infección sistémica letal ( $10^6$  células de la cepa CAF2-OVA) en tres grupos de ratones previamente tratados con *C. albicans*: colonización gastrointestinal, colonización seguida de infección subletal (C+I) y sin ningún tratamiento previo como grupo control. El grupo control corresponde a ratones infectados con la misma dosis ( $10^6$  células) sin ningún tratamiento previo. B) Porcentaje de supervivencia en los cuatro grupos analizados. En ambos gráficos, el tiempo 0 corresponde al inicio de la infección sistémica letal. \* $p < 0,05$

En la Figura 52B se muestra la supervivencia de los ratones de los tres grupos tras la infección letal: el grupo control (sin colonización fúngica) muere al cabo de 7 días, mientras

que los grupos de ratones colonizados y C+I muestran un aumento significativo de la supervivencia: el grupo C+I aumenta hasta 13 días, mientras que el grupo de los ratones sólo colonizados aumenta hasta 17 días. Estos datos permiten concluir que la colonización intestinal con *C. albicans*, al menos en las condiciones experimentales indicadas, confiere cierta protección parcial frente a una infección fúngica posterior.

## Discusión

---



Las enfermedades causadas por hongos continúan siendo en la actualidad un importante problema sanitario. Sus manifestaciones clínicas se dividen en las de tipo superficial, normalmente de carácter más leve, o sistémicas, graves y asociadas frecuentemente con una elevada mortalidad. Por ello, las infecciones fúngicas suponen un desafío actual tanto para la investigación básica como aplicada, que se orienta hacia el diseño de nuevas estrategias para su diagnóstico, prevención y la obtención de nuevos fármacos eficaces en su control. El conocimiento tanto de los mecanismos de patogenicidad fúngica como de la respuesta inmunitaria tiene una evidente importancia para el desarrollo de nuevas vacunas y moléculas con capacidad antifúngica. A pesar de que en los últimos años se ha incrementado la diversidad de especies encontradas en las infecciones fúngicas desarrolladas por pacientes inmunocomprometidos, *Candida albicans* continúa siendo la especie de *Candida* más frecuentemente asociada a enfermedades de este hongo y es por ello la más usada como modelo para el estudio de la patogénesis fúngica.

En este trabajo hemos caracterizado el papel de Tup1, un regulador de la transición levadura a hifa en el hongo dimórfico y oportunista *C. albicans*, con el objetivo de entender el papel del dimorfismo durante el curso de la interacción de esta levadura con el hospedador, y en particular, su función en la colonización del tracto gastrointestinal de mamíferos y la respuesta inmunitaria generada durante el curso de la misma.

## A. Papel del gen *TUP1* en la interacción de *C. albicans* con el hospedador

La transición de levadura a hifa de *C. albicans* (fenómeno conocido como transición dimórfica) es uno de los aspectos históricamente más estudiados en la biología de este hongo (Berman, 2006; Biswas *et al.*, 2007; Whiteway *et al.*, 2007). Se trata de un proceso ampliamente descrito en la literatura que se induce en respuesta a determinados cambios ambientales. Ambas morfologías presentan diferencias notables en la estructura y composición de la pared celular, en el tipo de crecimiento, en el patrón de expresión génica y en su capacidad de invasión de tejidos, entre otras (Gow, van de Veerdonk, *et al.*, 2012). La relevancia de la filamentación de este hongo en el hospedador se ha analizado principalmente en el contexto de su potencial relación con la virulencia y el proceso infeccioso (Biswas *et al.*, 2007; Kumamoto *et al.*, 2005; Mitchell, 1998; Odds, 1994; San-Blas *et al.*, 2000), aunque también es un rasgo taxonómico utilizado en clínica para el diagnóstico de *C. albicans* en muestras biológicas.

El hecho de que la filamentación se induzca en condiciones que mimetizan el curso de una infección sistémica (temperatura cercana a 37 °C, pH>7 y presencia de factores nutricionales como el suero) ha sido la base para considerar durante mucho tiempo que los filamentos eran la forma virulenta del hongo, por contraposición a la forma levaduriforme inocua. Sin embargo, esta observación no ocurre en otros hongos dimórficos como *Histoplasma capsulatum* o *Paracoccidioides brasiliensis* en los que la

forma hifal (micelio) es la habitual en la naturaleza mientras que la levaduriforme es la que se aísla preferentemente de los tejidos del hospedador. Tradicionalmente, el estudio de este proceso en *C. albicans* se ha llevado a cabo empleando mutantes alterados en su regulación, como el mutante *efg1 cph1* descrito por Fink y cols. (Lo *et al.*, 1997), incapaz de filamentar en diversas condiciones experimentales o cepas hiperfilamentosas, como *hog1* (Alonso-Monge *et al.*, 1999), *nrg1* (Murad *et al.*, 2001) o *tup1* (Braun, 1997). Estos “mutantes morfológicos” permitían el estudio de una forma específica del hongo durante el curso de una infección en un modelo experimental (frecuentemente el modelo de infección sistémica en ratón) pudiendo determinarse su contribución a la virulencia del hongo *in vivo* mediante el análisis de curvas de mortalidad experimental, la cuantificación del alojamiento en órganos diana del animal *post mortem* o mediante su capacidad de interacción con células del hospedador (frecuentemente de naturaleza inmunitaria) tanto *ex vivo* como *in vitro*.

Para determinar la influencia de la transición levadura-micelio en la virulencia de *C. albicans*, se han empleado cepas condicionales en las que la filamentación es controlada mediante el sistema de regulación por tetraciclina. El grupo de Saville y colaboradores describió la caracterización de un mutante condicional en el cual regulaban la filamentación modulando la expresión de *NRG1*, gen represor de la filamentación (Saville *et al.*, 2003a). La obtención de esta cepa permitía el análisis del mecanismo de filamentación durante el curso de la infección y eliminaba la necesidad de compararla con una cepa silvestre. La inducción de la filamentación de este mutante en un modelo de infección sistémica suponía un aumento de la mortalidad apreciable en animales en relación a aquellos que no fueron tratados con doxiciclina, reflejando así la importancia de la transición dimórfica en la patogénesis de *C. albicans* aunque el alojamiento era muy similar en ausencia o presencia de doxiciclina (Saville *et al.*, 2003a). Estos datos reflejaban claramente que es el propio proceso de filamentación (y no una morfología concreta) la que puede relacionarse con la virulencia del hongo en el modelo experimental usado.

En el momento de inicio de esta tesis doctoral no existían trabajos que hubiesen estudiado las consecuencias de la transición levadura-hifa en la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal. Este fue uno de los objetivos iniciales de este trabajo y para ello nos planteamos la obtención de un sistema con el que pudiéramos analizar la contribución relativa de ambas formas, levadura e hifa, en el tracto intestinal. Nos planteamos por ello desarrollar cepas en la que la inducción de la filamentación pudiera ser realizada a voluntad del investigador, y para ello escogimos el regulador transcripcional Tup1.

El gen *TUP1* fue identificado por el grupo del Dr. Johnson en 1997. Se trata de un regulador transcripcional descrito en *S. cerevisiae* (Keleher *et al.*, 1992) que regula negativamente en *C. albicans* la transición dimórfica (Braun, 1997). Su delección conducía a la formación de una morfología hifal en la práctica totalidad de las condiciones experimentales estudiadas, a diferencia de *Cph1*, el homólogo de *Ste12* en *C. albicans*, que manifestaba solo alteraciones relativas al crecimiento hifal en medios sólidos en condiciones de ayuno de nitrógeno (Kohler *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1994). Los filamentos del

mutante *tup1* son similares (morfológicamente al menos) a los filamentos estándar detectados en presencia de suero, el medio inductor estándar, por lo que consideramos este tipo de filamentación similar a la generada de manera natural en las condiciones fisiológicas en el interior del hospedador. En este trabajo se ha optado por generar mutantes en los que la inducción de la forma hifal se haga a voluntad del experimentador y para ello, se ha construido una cepa en la que la expresión de *TUP1* estuviera regulada genéticamente por el sistema de doxiciclina.

La obtención de una cepa con capacidad de filamentación condicional en *C. albicans* fue técnicamente compleja. Usando la estrategia estándar desarrollada por Fonzi e Irwin (Fonzi *et al.*, 1993), se intentó delecionar un alelo y reemplazar el alelo remanente con una versión regulada por un promotor inducible. Sin embargo, esta aproximación resultó infructuosa tras numerosos intentos incluso en diferentes fondos genéticos. Este tipo de comportamiento se ha descrito por diversos autores en la construcción de cepas modificadas genéticamente y podría derivarse de la relativa alta frecuencia de recombinación no homóloga de fragmentos de DNA en este organismo. Aunque es difícil argumentar sobre resultados negativos, en *C. albicans* se han descrito en diversas ocasiones que la cepa intermedia heterocigota en un proceso de delección génica presenta un fenotipo intermedio con la cepa delecionada (De Backer *et al.*, 2000), hecho que algunos autores interpretan como una adaptación evolutiva de esta levadura al estado diploide (Jones *et al.*, 2004). El papel de *TUP1* como regulador transcripcional (Braun, Head, *et al.*, 2000) podría quizá condicionar la capacidad de recombinación del hongo y explicar la no obtención de mutantes utilizando la estrategia anterior. En cualquier caso, este hecho pudo ser solventado optando por la estrategia directa utilizando la cepa original *tup1* (homocigota) desarrollada por B. Braun. Su manipulación, sin embargo, fue compleja y técnicamente difícil: la formación constitutiva de micelio fúngico dificultaba el recuento de células, la cuantificación del crecimiento microbiano, la extracción de proteínas y, sobre todo, la propia transformación genética. Tras numerosos intentos, conseguimos transformar el mutante homocigoto con una copia ectópica del gen *TUP1* en la región *ADH1* bajo el control del promotor regulado por tetraciclina.

Uno de los primeros puntos en que nos centramos con la cepa obtenida fue la validación del modelo de expresión génica regulable *in vivo*. Aun cuando se han descrito diferentes sistemas de regulación de la expresión génica (Eckert *et al.*, 2009), la mayoría de ellos no son adecuados para estudios *in vivo*. Los más utilizados son *ACT1* o *TDH3*, de expresión constitutiva, mientras que otros como *MET3* (Care *et al.*, 1999), *MAL2* (Brown *et al.*, 1996), *PCK1* (Leuker *et al.*, 1997) o *SAP2* (Hube *et al.*, 1994) dependen de factores nutricionales (ayuno de metionina, presencia de maltosa, presencia de succinato o presencia de proteínas en el medio) que no pueden utilizarse y menos controlarse durante el curso de la interacción con células de mamífero o en estudios *in vivo* en el curso de una infección. Esta dependencia hace que la mayoría de ellos tampoco sean adecuados para la identificación de factores de virulencia del hongo que suelen requerir el uso de modelos celulares o animales.



El desarrollo del sistema de regulación por tetraciclina fue descrito hace mucho tiempo (Gossen *et al.*, 1992) en *Escherichia coli* y adaptado a *S. cerevisiae* por el grupo del Dr. Herrero que desarrolló vectores eficaces de naturaleza episómica y centromérica en esta levadura (Gari *et al.*, 1997). Posteriormente, Nakayama y colaboradores desarrollaron versiones para *C. albicans* mediante la adaptación de codones del transactivador tTA, que posibilita su expresión en esta levadura (Nakayama *et al.*, 2000). Estos autores demostraron su utilidad para controlar la expresión de genes como la N-miristoil transferasa o el factor de elongación de la traducción 3 (*TEF3*) *in vivo*, demostrando un defecto de crecimiento dependiente de la adición de doxiciclina al medio. En nuestro caso, y aunque se desarrollaron dos tipos de variantes de construcciones, optamos por usar las versiones reprimibles (desarrolladas por la Dra. L. Cowen), al objeto de evitar el mantenimiento de la morfología levaduriforme, en la medida de lo posible, mediante la presencia del antibiótico. Como sistema de inducción se ha utilizado doxiciclina o aCT (clortetraciclina autoclavada; ver más adelante).

Los estudios *in vitro* realizados con la cepa condicional TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> (o su versión inducible) indican que esta cepa mostraba una regulación estrictamente dependiente de la adición o eliminación de doxiciclina en el medio. La cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> no obstante, presenta una tasa de crecimiento menor que la cepa silvestre CAF2, existiendo una diferencia de ~ 21 minutos entre el tiempo de generación de ambas (Figura 18). Una de las razones *a priori* de dicha diferencia podría derivar de la integración de la construcción genética en el locus *ADH1*. *ADH1* codifica una alcohol deshidrogenasa citoplásmica que se comporta como un fuerte inmunógeno y tiene un papel relevante en el metabolismo celular (Bertram *et al.*, 1996). Sin embargo, en otras construcciones genéticas similares de nuestro grupo (Herrero de Dios *et al.*, 2013; Prieto *et al.*, 2014; Urrialde *et al.*, 2015), no hemos observado dicho efecto, por lo que más que un efecto de heterozigosis del gen *ADH1* pensamos que podría deberse a la elevada expresión del gen *TUP1*. El promotor utilizado es nuestra construcción genética es más fuerte incluso que el promotor *ACT1* (Barelle *et al.*, 2004) y *TDH3* (Keppler-Ross *et al.*, 2008; Nett *et al.*, 2010), ambos utilizados con frecuencia en estudios de sobreproducción en *C. albicans*. Dado el papel de *TUP1* como regulador transcripcional su expresión podría provocar cambios relevantes en la expresión de genes diana. Se ha descrito que *TUP1* regula en *C. albicans* la expresión de genes relacionados con el metabolismo alternativo de ciertas fuentes de carbono (Levitin *et al.*, 2007) aunque en nuestro caso no hemos evidenciado cambios significativos en la tasa de crecimiento en diferentes fuentes de carbono respecto del comportamiento de una cepa silvestre. La alteración de la expresión de Tup1 podría suponer una alteración implicados en la captación de nutrientes, la adaptación al pH o incluso a la temperatura. Es importante comentar en este contexto que la construcción del mutante homocigoto original *tup1* de *C. albicans* se llevó a cabo a partir de cepas *ura3*, generadas mediante el sistema *URA Blaster*. En este sistema se usa el marcador *URA3* flanqueado por regiones de DNA idénticas (Fonzi *et al.*, 1993) para seleccionar eventos de recombinación que produzcan auxótrofos en uracilo (Ura-); como consecuencia, muchas de las cepas mutantes generadas usando este sistema son heterocigotas para el gen *URA3* y presentan, por ello, una alteración en los niveles de expresión del gen (Lay *et*

*al.*, 1998; Staab *et al.*, 2003). La delección del gen *URA3* genera cepas avirulentas, (Kirsch *et al.*, 1991) y la exposición de *C. albicans* al antimetabolito 5-FOA (empleado para seleccionar transformantes carentes del marcador *URA3*) provoca con frecuencia reorganizaciones genéticas. Es posible que la sobreproducción de *TUP1* en una cepa heterocigota *URA3/ura3* produzca efectos perjudiciales en el crecimiento puesto que la alteración de los niveles del gen/enzima *URA3* tiene efectos drásticos en la fisiología de la célula fúngica.

Nuestros datos de sensibilidad a antifúngicos evidencian igualmente cambios en la cepa *TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>* al inducirse la filamentación en presencia de doxiciclina (o aCT). La inducción de la filamentación en la cepa *TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>* provoca una mayor sensibilidad a miconazol y fluconazol (Figura 23). Una posible explicación de este comportamiento sería un cambio en los niveles de la enzima diana, Erg11, el blanco de acción de los azoles. En *S. cerevisiae* se ha descrito que el represor Hap1 (dependiente de la disponibilidad de oxígeno en el medio) juega un papel importante en la regulación de algunos genes implicados en la biosíntesis de ergosterol, y ello lo hace mediante la unión al complejo represor Ssn6-Tup1 (Hickman *et al.*, 2007). Podría suceder que la alteración de los niveles de Tup1-Ssn6 en *C. albicans* provoque una alteración en la regulación de *ERG11*, y ello conlleve a un diferente contenido de ergosterol en la membrana que pudiera traducirse en una mayor sensibilidad a estos antifúngicos. Este razonamiento es válido para ambos azoles, aunque el miconazol actúa también generando estrés oxidativo en la célula (Belenky *et al.*, 2013). Nuestros datos también indican que la forma filamentosa es más sensible a la anfotericina B, compuesto que se une al ergosterol de la membrana celular provocando la muerte de la célula y siendo también un inductor de estrés oxidativo en la misma (Mesa-Arango *et al.*, 2016b). Puesto que la cepa *TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>* no muestra una mayor sensibilidad a oxidantes (datos no mostrados), pensamos que nuestros datos sugieren más bien una conexión entre *TUP1* y la funcionalidad de la membrana plasmática en *C. albicans*, proceso que pudiera venir mediado por la composición (contenido en ergosterol) de la misma.

Nuestros datos indican también que la forma filamentosa derivada de la represión de *TUP1* parece ser más resistente que la forma levaduriforme a compuestos como el rojo Congo o el blanco de calcoflúor (Figura 22), lo que sugiere alteraciones en la pared celular, bien en la síntesis de quitina, de  $\beta$ -(1,3)-glucano o de otros componentes. Durante la formación de hifas, la estructura y la composición de la pared celular de *C. albicans* sufre diversas modificaciones (Chaffin, 2008). Estos cambios afectan a la exposición de elementos de la pared, como  $\beta$ -glucanos, mananos o quitina, lo cual interfiere en la interacción con los receptores de células inmunitarias y es un factor importante de la adhesión a determinadas superficies. Esta capacidad de adhesión de *C. albicans* a diversas superficies mucosas o tejidos de órganos del hospedador, así como a materiales sintéticos, es un factor clave implicado en la capacidad de colonizar. Es el primer paso fundamental para el establecimiento de la colonización, facilitando la filamentación del hongo y la formación de biopelículas, lo cual influye a su vez en la resistencia tanto a antifúngicos como a los mecanismos de defensa del hospedador. La presencia de adhesinas específicas en la pared celular promueve la interacción con proteínas o

carbohidratos de la pared celular de células del sistema inmunitario (Henriques *et al.*, 2006; Jayatilake, 2011; ten Cate *et al.*, 2009).

Mediante estudios de expresión diferencial usando arrays, se han identificado un grupo de genes denominados RBT ("*repressed by Tup1*") (Braun & Johnson, 2000) que se encuentran en la pared celular, presentando un anclaje de tipo GPI. La implicación de algunas de estas proteínas en adhesión celular se ha caracterizado en los últimos años. Sin embargo, resulta llamativo que, hasta el momento, la mayor parte de las dianas identificadas de Tup1 son responsables de la mayor capacidad de interacción con superficies de la morfología filamentosa. Los datos descritos en la literatura, indican que la filamentación específicamente mediada por *TUP1* induce proteínas implicadas en una mayor adhesión a distintas superficies. Sin embargo, los datos presentados en este trabajo indican que, al menos en las condiciones ensayadas, la inducción de la filamentación mediada por la represión de *TUP1* determina una menor adhesión, tanto a superficies de poliestireno como al epitelio intestinal (Figuras 25 y 26).

Dentro de las proteínas reguladas por Tup1, se encuentra Hwp1, una manoproteína de la pared celular cuya producción se induce en respuesta a suero y está reprimida por Tup1 (Henriques *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2011; Sharkey *et al.*, 1999; Wachtler *et al.*, 2011). Esta proteína funciona como un sustrato para la transglutaminasa de las células eucariotas, de forma que las células de morfología filamentosa pueden establecer uniones covalentes con las células del hospedador durante la invasión (Staab *et al.*, 1999). Esta adhesina fue la primera en ser identificada como esencial en la formación de biopelículas y está regulada por la endoproteinasa Kex2, por lo que está implicada en la virulencia del hongo y en su resistencia a antifúngicos (Naglik *et al.*, 2004; Nobile, Nett, *et al.*, 2006). La familia de genes ALS codifica para glicoproteínas de la superficie celular, similares a aglutininas (Cota *et al.*, 2015; Hoyer *et al.*, 2016) e implicadas en adhesión. Presentan cierta similitud con las inmunoglobulinas, ya que se unen a péptidos formando agregados con otros microorganismos patógenos. Esta familia se compone de 8 genes, de los cuales *ALS1*, *ALS3* y *ALS5* son los principales implicados en la adhesión de *C. albicans* a gran variedad de superficies (Henriques *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011). Estas proteínas presentan diferencias estructurales entre ellas, lo cual aumenta su potencial de adhesión y por lo tanto su capacidad de colonización (Murciano *et al.*, 2012; Sheppard *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2007). En concreto, sólo Als3 es responsable de la adhesión del hongo al epitelio intestinal (Murciano *et al.*, 2012). Esta proteína es importante en la interacción con células epiteliales y los mutantes *als3* tienen menor capacidad de adhesión a ciertas superficies como las células endoteliales, células de la mucosa oral y otros soportes como gelatina, fibrinógeno o colágeno (Liu *et al.*, 2011; Murciano *et al.*, 2012).

El papel regulador de Tup1 se dirige, entre otros, a proteínas con un papel fundamental en adhesión, como Als3 y Hwp1 (Kadosh *et al.*, 2005; Murad *et al.*, 2001). Del mismo modo, Tup1 regula a la proteína Ece1, también implicada en adhesión (Birse *et al.*, 1993; Nobile, Andes, *et al.*, 2006). Por otro lado, la proteína Eap1, específica de *C. albicans*, participa en la adhesión a superficies plásticas hidrofóbicas, como es el poliestireno, además de ser

necesaria en el proceso de formación de *biofilms* (ten Cate *et al.*, 2009). Eap1 está regulada por el factor de transcripción Efg1, a su vez regulado por Tup1, por lo que es posible que la alteración en los niveles de Tup1 afecte a los de Eap1 y ello se refleje en una disminución en su capacidad de adhesión a poliestireno. Todos estos datos nos sugieren que la represión de *TUP1* y por tanto, la inducción de la filamentación determinan una disminución de la capacidad de adhesión, lo que podría explicarse por una alteración en la producción de estas proteínas de adhesión.

La transición dimórfica es uno de los aspectos que condicionan la interacción del hongo con las células fagocíticas del hospedador, como neutrófilos o macrófagos. La internalización del hongo por parte de estas células las expone a un microambiente ácido que es capaz de neutralizar (Vylkova *et al.*, 2014). La formación del fagolisosoma lleva a *Candida* a modular el pH para impedir así la activación de los enzimas hidrolíticos. A su vez, la formación de este fagolisosoma conlleva la reprogramación transcripcional del hongo, lo que promueve la formación de hifas (Lorenz *et al.*, 2004). La filamentación, de esta forma, es uno de los factores que ayudan a *C. albicans* a escapar de estas células y evita que sean fagocitadas (Ghosh *et al.*, 2009; Marcil *et al.*, 2002; McKenzie *et al.*, 2010). La forma filamentosa posee ciertas ventajas para evitar la fagocitosis, como es el gran tamaño que pueden alcanzar las hifas en relación a las células inmunitarias (Lewis *et al.*, 2012). La internalización de la levadura en el macrófago promueve la filamentación, lo que facilita la rotura del macrófago y la liberación del hongo. Así, el mutante *efg1 cph1*, bloqueado en la morfología de blastospora, es incapaz de escapar del macrófago tras su fagocitosis (Fernandez-Arenas *et al.*, 2009). Nuestros datos coinciden con los ya descritos por otros autores: la inducción de la filamentación, aunque no parece afectar al porcentaje de fagocitosis, sí se refleja en la supervivencia de la cepa *TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>*. El porcentaje de muerte correspondiente a la forma filamentosa es inferior al de la forma levaduriforme tanto en neutrófilos como en macrófagos (Figuras 27 y 28).

Los datos previos descritos en la bibliografía sugieren que esta diferencia en la supervivencia a células fagocíticas podría estar relacionada no sólo con la filamentación sino también con las diferencias en la composición de la pared celular de ambas morfologías. La estructura de la pared supone una conexión entre el hongo y el hospedador, por lo que su composición es clave en dicha interacción. La supervivencia depende en parte de la integridad de la pared celular, ya que una correcta estructura y composición de ésta es fundamental ante el estrés osmótico y físico. La interacción entre los receptores de la pared fúngica y los de las células inmunitarias activan diversas cascadas de señalización que promueven el reordenamiento de actina en el citoesqueleto y la remodelación de la membrana. Estos procesos son necesarios para la fagocitosis y para la producción de metabolitos tóxicos y enzimas hidrolíticas por parte de las células del hospedador, que posteriormente secretan citoquinas pro o antiinflamatorias (Filler, 2006; Levitz, 2010; Netea, Brown, *et al.*, 2008). Los principales receptores pertenecen a las familias de lectinas de tipo C y de receptores de tipo Toll, e incluyen proteínas que reconocen mananos, glucanos, quitina y posiblemente complejos de varios carbohidratos combinados (Goodridge *et al.*, 2009; Willment *et al.*, 2008). En concreto, la interacción entre  $\beta$ -1,3-glucano y Dectin-1 es crucial en el reconocimiento del hongo y en el

mecanismo de fagocitosis, además de inducir la respuesta de tipo  $T_H17$  (Brown *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2003; Gantner *et al.*, 2005; Willment *et al.*, 2008). Este reconocimiento se produce en la forma levaduriforme, pero no en hifas, debido a la distinta exposición de  $\beta$ -glucano en ambas morfologías (Gantner *et al.*, 2005; Wheeler *et al.*, 2008). Es por ello que la distinta exposición de dicho elemento en la pared celular de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> durante su filamentación podría estar relacionada con el reconocimiento por parte de fagocitos.

La forma filamentosa de *C. albicans* se consideró durante años más virulenta por su capacidad de invadir tejidos, mientras que la blastospora parecía ser más adecuada para la diseminación por el torrente sanguíneo. La virulencia atenuada de ciertos mutantes incapaces de filamentar apoyaba esta hipótesis (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). En la actualidad se sabe que el verdadero factor de virulencia es el mecanismo de transición de levadura a hifa, y no una morfología en concreto (Braun & Johnson, 2000; Ernst, 2000; Liu, 2001; Saville, Lazzell, *et al.*, 2006; Saville *et al.*, 2009; Saville *et al.*, 2003a). Nuestros datos muestran que la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> es avirulenta; la infección sistémica con dosis que son letales usando una cepa silvestre resultan en una supervivencia del 100 % (Figura 39). La avirulencia de esta cepa, además, parece ser independiente de la morfología ya que la inducción de la filamentación no afecta a la supervivencia ni al peso de los ratones. El hecho de que la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> sea avirulenta en el modelo de infección sistémica empleado ha dificultado el estudio de la importancia de la filamentación en este proceso. La caracterización del mutante *tup1* ha mostrado cómo una cepa con fenotipo hiperfilamentoso resultaba ser avirulenta (Braun, 1997; Murad *et al.*, 2001). Sin embargo, sí hemos observado diferencias significativas en los valores de alojamiento en órganos diana durante la infección al inducir transición dimórfica. La inducción de la filamentación en el curso de la infección resulta en una disminución progresiva en los valores de alojamiento en riñones, lo que estaría en concordancia con la disminución de la adhesión descrita previamente, así como a su mayor sensibilidad a la lisis por los fagocitos. Este menor alojamiento en riñones que muestran las hifas durante la infección sistémica está en concordancia con los resultados descritos por Saville y colaboradores (Saville *et al.*, 2008) empleando también una cepa de filamentación controlada.

En relación a la capacidad de colonización de la cepa ensayada, nuestro grupo de investigación ha implementado recientemente un modelo de colonización intestinal en ratón por *C. albicans*. Este modelo ha sido eficaz para mostrar el efecto de ciertos mutantes como las MAPKs Mkc1, Cek1 y Hog1 o el factor de transcripción Pho4 en el curso de la colonización (Prieto *et al.*, 2014; Urrialde *et al.*, 2016) y consideramos que era adecuado para abordar un aspecto desconocido en el momento de inicio de este trabajo como era el papel que juega el dimorfismo en el curso de una colonización en el modelo de ratón.

En primer lugar, hemos validado el uso de aCT en estudios *in vivo*. Las tetraciclinas no parecen tener influencia en la morfología celular de *C. albicans* en condiciones de crecimiento estándar *in vitro* en laboratorio ni tampoco parecen influir en otros procesos morfogenéticos como la transición *white-opaque* (Park & Morschhauser, 2005). Existen

datos recientes que validan su utilización para el estudio *in vivo* de la patogénesis de la enfermedad infecciosa: la presencia de doxiciclina no influye en la virulencia de una cepa silvestre de referencia (CAF2) de *C. albicans* en el modelo de infección sistémica en ratón (Chaturvedi *et al.*, 2011) y tampoco altera de forma significativa el patrón histopatológico de tejidos infectados por este hongo en tejidos diana durante el curso de la misma. Tampoco altera de forma relevante los biomarcadores ni el patrón de citoquinas generadas durante el curso de la infección. La utilización de tetraciclinas en estudios de interacción con el hospedador, a pesar de ser de gran utilidad en la regulación génica, presenta ciertas limitaciones. Estos compuestos inhiben la síntesis proteica mediante el bloqueo de la unión del aminoacil-tRNA al complejo de traducción y además de su función antibiótica, se han descrito efectos antiapoptóticos, antimetastásicos y antioxidantes en células de mamífero a la vez que parecen tener un papel antiinflamatorio y modulador de la respuesta inmune (Amin *et al.*, 1996; Dunston *et al.*, 2011; Gilbertson-Beadling *et al.*, 1995; Yrjanheikki *et al.*, 1999).

Puesto que la acción antibiótica de las tetraciclinas es esencial para la interpretación de los estudios de colonización, fue necesario validar su uso en estudios de regulación de la expresión génica *in vivo* en condiciones de comensalismo. Con el objetivo reducir estos posibles efectos secundarios de las tetraciclinas, y que podrían afectar a los estudios *in vivo* y especialmente a la microbiota intestinal (ya que son antibióticos de amplio espectro), decidimos usar la clortetraciclina, que presenta unas características farmacocinéticas diferentes frente a la doxiciclina; su vida media es de aproximadamente 5 horas (frente a las 18-22 horas de la doxiciclina), y tiene una menor absorción (30 frente a un 95%). La variante autoclavada utilizada (aCT), presenta una menor actividad antibiótica y es igualmente eficaz en la regulación de la expresión génica tanto *in vitro* como en los ensayos llevados a cabo en animales.

Aun cuando existen modelos de en los que se opta por administrar *C. albicans* de forma oral en el agua de bebida (Cutler *et al.*, 2011), en nuestro caso hemos usado una única administración intragástrica, lo cual es más preciso al conocer la dosis exacta de microorganismo viable inoculado. En nuestro modelo de comensalismo, las tasas de colonización estables se alcanzan en apenas tres días tras la inoculación, y son relativamente independiente de la dosis inicial administrada (Prieto *et al.*, 2015). A pesar de ello, la utilización intragástrica en dosis única tiene ventajas, por cuanto la cantidad administrada es conocida, y el animal no está sometido continuamente a una inoculación diaria que dificulta el análisis de los resultados. Nuestros resultados indican que la utilización de aCT a 1 mg/mL en el agua de bebida es un régimen adecuado para inducir la filamentación de la cepa en el interior del intestino (Figura 31). Este compuesto tiene una muy reducida actividad antibiótica al menos 50-100 veces inferior a la tetraciclina y mantiene la capacidad de inducción o represión del sistema TET, de forma que nuestros datos validan su uso en experimentos *in vivo*. La adición de aCT produce una disminución de la colonización fúngica de la cepa TUP1<sup>REP</sup> en el intestino (Figura 34). Dicho comportamiento pensamos que se debe mayoritariamente a la inducción de la forma hifal en la levadura, y no a los cambios que se pudieran producir en la microbiota. De hecho, la concentración de aCT determinada por bioensayo (filamentación) es cercana a los 16



µg/mL (Figura 32), lo que supone una concentración antibiótica efectiva del orden de 0,16-0,32 µg/mL que aunque no es despreciable, pensamos que no es determinante en el cambio de colonización.

El uso de las tetraciclinas no está excesivamente documentado en estudios con este hongo. La adición de tetraciclinas de forma oral continuada en modelos de colonización gastrointestinal se refleja en una disminución notable de la población de estreptococos (Mellado *et al.*, 2000). Existen estudios que describen que el uso de estos antibióticos favorece la proliferación de *C. albicans* en modelos de cultivo continuo *in vitro* y se ha descrito cómo en estos modelos, la presencia de especies de *Lactobacillus* disminuye la tasa de colonización fúngica (Payne, 2013). En ratas, la administración de tetraciclinas es capaz de estimular la colonización oral por *C. albicans* (Hassan *et al.*, 1985). Las tetraciclinas aumentan la proliferación de *C. albicans* en el tracto superior de ratas en un modelo de diabetes, lo que se traduce en la aparición de lesiones en la mucosa orofaríngea (Sano *et al.*, 2012). Se ha descrito que su uso no parece influir en la colonización en ratones sanos de tipo BALB/c, no encontrándose cultivos positivos en heces para este hongo tras dos semanas de tratamiento con 1 mg/mL de tetraciclina tras una inoculación oral (Narayanan *et al.*, 1991). La administración de tetraciclinas conjuntamente con una dieta rica en glucosa es capaz de producir la colonización de ratones CD-1 tanto de *C. albicans* como de otras especies de *Candida* como *C. tropicalis* o *C. parapsilosis* (Mellado *et al.*, 2000). Estos autores indican tasas de colonización cercanas a 10<sup>5</sup> CFUs/g, del orden de una unidad logarítmica inferior a las tasas alcanzadas en nuestro modelo.

La administración de tetraciclinas tiene, por otro lado, un efecto evidente en el ecosistema intestinal. Se ha descrito que la adición de tetraciclinas de forma continuada durante dos semanas conduce a una reducción de un 50% de la diversidad microbiana (Yin *et al.*, 2015), con un aumento gradual de la aparición de miembros de la clase *Firmicutes* y disminución de los de la clase *Bacteroidetes*, cambios que también tiene reflejo en una alteración de metabolitos en suero de los animales. La utilización de distintas combinaciones antibióticas ha demostrado ser esencial para el establecimiento de los modelos animales de comensalismo en este hongo. El uso de estreptomycin, bacitracina y gentamicina es una combinación antibiótica estándar (Wiesner *et al.*, 2001) que produce una reducción muy apreciable de la población microbiana. Actualmente se está utilizando también la vancomicina (C. D'Enfert, comunicación personal) debido a su relativa ineficacia en la población de lactobacilos o la clindamicina (E. Román, comunicación personal) de gran actividad frente a la flora anaerobia que constituye la mayor parte de la microbiota del tracto gastrointestinal. El antibiótico que más se utiliza en este tipo de tratamientos es la penicilina, cuyo efecto sobre la microbiota anaerobia es muy notable, hecho que parece indicar que el mantenimiento de *C. albicans* en el intestino de ratón depende en buena medida de esta población microbiana.

En la actualidad no se conoce con precisión el papel que juega la microbiota en el grado de colonización por *C. albicans* en el intestino. El tracto intestinal alberga la mayor y más compleja comunidad microbiana del cuerpo humano y la población de la microbiota que

habita el tracto gastrointestinal es mayoritariamente bacteriana, aunque también se encuentran microorganismos eucariotas y procariotas pertenecientes al dominio *Archaea* (Marchesi, 2010). La microbiota intestinal incluye alrededor de 500 especies bacterianas pertenecientes a más de 50 géneros distintos. Los microorganismos que la componen se distribuyen a lo largo de todo el intestino, aunque la región del colon presenta una mayor concentración (Kolida *et al.*, 2006). Diversos estudios han revelado que, a pesar de la gran diversidad de hongos presentes en el intestino, las especies del género *Candida* son las más frecuentes (Ghannoum *et al.*, 2010; Ott *et al.*, 2008). Junto con otros hongos comensales, *Candida* se encuentra a lo largo del intestino de gran variedad de mamíferos, siendo el colon el segmento del tracto en el que se detecta una mayor concentración (Iliev *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 2009). La posible eliminación de parte de la microbiota intestinal es un factor clave para facilitar la proliferación de *C. albicans* y la invasión de ésta a través del epitelio intestinal (Samonis *et al.*, 2005). El mecanismo de competición entre el hongo y la microbiota bacteriana incluye procesos como la secreción de toxinas por parte de las bacterias, la competición por la asimilación de nutrientes y por la adhesión al epitelio. Algunas moléculas producidas por las bacterias, como el indol o su derivado indol-3-acetonitrilo, bloquean la formación de biopelículas de *C. albicans* en el intestino, así como su adhesión a células epiteliales intestinales (Yan *et al.*, 2013).

En los estudios de colonización intestinal es importante tener en consideración elementos relevantes en la microbiota del intestino, como son las bacterias SFB (*segmented filamentous bacteria*). La primera evidencia de la existencia de estos microorganismos se describió en 1974 (Davis *et al.*, 1974). Se trata de bacterias Gram positivas, formadoras de esporas y de morfología filamentosa, que comprenden un tamaño de entre 0,7 y 1,8  $\mu\text{m}$  y que colonizan la región del íleon de roedores, entre otras muchas especies (Jiang *et al.*, 2001; Savage, 1969). Las bacterias SFB presentan una elevada dependencia del resto de microorganismos en cuanto a la asimilación de nutrientes. En concreto, su establecimiento en el intestino se da en nichos en los que hay mayor disponibilidad de cobalamina (vitamina 12) y en el caso de roedores, se adhieren a las microvellosidades de absorción y al epitelio del folículo que recubre las placas de Peyer (Caselli *et al.*, 2010; Jepson *et al.*, 1993; Klaasen *et al.*, 1992; Lowden *et al.*, 1995).

Estudios recientes han mostrado como las bacterias SFB son un componente clave en la microbiota intestinal, ya que afectan de forma significativa a la respuesta inmune del hospedador, incluyendo la respuesta innata y la respuesta adaptativa tanto celular como humoral (Denning *et al.*, 2011; Ivanov *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2008). Dada la importancia de la mucosa en prácticamente todos los modelos de infección intestinal, la gran influencia que presentan las bacterias SFB plantea muchas preguntas con respecto a su efecto en los modelos de colonización en intestino. Además, se ha demostrado como estas bacterias incrementan la respuesta inflamatoria a través de la respuesta de tipo  $T_H17$  (Goto *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2011), a la vez que parecen generar cierta protección ante enfermedades como diabetes (Kriegel *et al.*, 2011), planteando así nuevas preguntas sobre sus posibles efectos así como los de otros microorganismos en la microbiota. Por tanto, ante el empleo de modelos de roedores en el estudio de infecciones, la presencia



de las bacterias SFB debe de ser considerada como un importante factor que pueda justificar o variar los resultados de estudio (Ericsson *et al.*, 2014).

Los ensayos de colonización llevados a cabo en este trabajo muestran que la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> es capaz de establecerse en el intestino y mantener una colonización estable alrededor de 10<sup>5</sup> CFUs/gramo (Figura 33); esta tasa de colonización es inferior a la presentada por cepas silvestres, como la SC5314 o CAI4, cercanas a 10<sup>7</sup> CFUs/g, pero se mantiene estable hasta al menos 21 días post inoculación. Curiosamente, las tasas alcanzadas por la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> son las normales en un inicio (~10<sup>7</sup>) pero disminuyen a los pocos días hasta alcanzar valores menores. El que se alcancen las tasas máximas en los primeros días está de acuerdo con datos de nuestro grupo que muestran cómo, independientemente de la dosis de levaduras inicialmente administrada, los valores estables de colonización se alcanzan en apenas tres días (Prieto *et al.*, 2015). Sin embargo, a partir del 5 día, esta tasa disminuye. Anteriormente, hemos observado que esta cepa es avirulenta en un modelo de infección sistémica. Aunque es capaz de mantener una colonización estable, lo hace mostrando valores inferiores que los correspondientes a una cepa silvestre. Este aspecto podría estar relacionado con su virulencia atenuada en una infección sistémica. La relación entre los defectos en colonización y en virulencia también se observa en el mutante *hog1*, cepa avirulenta (Alonso-Monge *et al.*, 1999) e incapaz de colonizar el intestino (Prieto *et al.*, 2014).

Existen diferentes motivos que pueden explicar esta disminución en la colonización. Uno de ellos, es la presencia de fenómenos de *quorum sensing*. En *C. albicans*, se ha descrito que moléculas como el tirosol (Chen *et al.*, 2004) o farnesol (Hornby *et al.*, 2001) son capaces de inhibir la proliferación del microorganismo *in vitro* y condicionan en buena medida la formación de biopelículas (Alem *et al.*, 2006; Ramage, Saville, *et al.*, 2002). De hecho, existen evidencias de que la expresión de *TUP1* se encuentra alterada en biopelículas sometidas a la acción del farnesol (Cao *et al.*, 2006). También se ha descrito que la adición de farnesol *in vitro* en *C. albicans* induce la expresión de *TUP1* y el bloqueo en la expresión de alguna de sus dianas como *HWP1* o *RBT1* (Kebaara *et al.*, 2008). Además, los mutantes *tup1* producen entre 16 y 18 veces más farnesol. Es por ello posible, que la expresión constitutiva de *TUP1* en condiciones de ausencia de doxiciclina, genere células con producción diferente de este compuesto o alteradas en la respuesta a la misma. En cualquier caso, es difícil de determinar el posible papel de esta molécula puesto que la caracterización de los fenómenos de *quorum sensing* se ha hecho principalmente *in vitro* y alejado de las complejas condiciones imperantes en el tracto gastrointestinal.

Hemos obtenido resultados similares al colonizar con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en competición con el mutante morfológico *efg1 cph1*, cuyo crecimiento y tasas de colonización en solitario presenta valores muy similares a los de una cepa silvestre. En cambio, la competición con la cepa *hog1*, incapaz de colonizar, no afecta al curso de la colonización de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, que mantiene los mismos valores de alojamiento en heces que al colonizar en solitario (datos no mostrados). Estos datos

sugieren una posible relación entre la dinámica de crecimiento y la capacidad de colonizar el intestino y mantener valores de alojamiento constantes a lo largo del tiempo.

Otra de las razones que pueden aducirse a esta menor colonización radica en una menor proliferación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en el tracto gastrointestinal. Mientras que en *S. cerevisiae* los mutantes *tup1* tienen diversos tipos de alteraciones metabólicas (Keleher *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1990), estas no son evidentes en el caso de *C. albicans*. De hecho, la capacidad de crecimiento de los mutantes *tup1* en galactosa, glucosa, sacarosa y acetato son similares a los de una cepa silvestre (Braun, 1997) y únicamente se ha descrito para este mutante una mayor acumulación de glicerol. En nuestro caso, no pensamos que la inducción de TUP1 en una cepa silvestre induzca cambios de crecimiento apreciables en el tracto gastrointestinal que puedan justificar esta menor tasa de colonización; al menos, el crecimiento en medios líquidos o sólidos *in vitro* de esta cepa no conduce a cambios significativos en su tasa de crecimiento *per se*. Descartamos también defectos asociados a la integración de la construcción en la región ADH1, lo que conduciría a cepas sobreproductoras en fondo heterocigoto para este gen; aun cuando la alcohol deshidrogenasa es un enzima metabólica expresada muy abundantemente en *C. albicans* (Bertram *et al.*, 1996), puesto que en nuestro grupo de investigación hemos usado este locus para dirigir construcciones que conducen a tasas igualmente elevadas de colonización, como hemos indicado anteriormente. Tampoco pensamos en atribuir dicho comportamiento a la temperatura; en *C. albicans* se ha descrito que los mutantes *tup1* son termosensibles a 42°C aunque el comportamiento es normal a 37°C y en nuestro caso, no hemos podido evidenciar diferencias de crecimiento *in vitro* a 37°C. Es posible, pues, que el defecto de crecimiento en la forma levaduriforme de la cepa ensayada se pueda deber a una menor tasa de crecimiento en las condiciones analizadas, debido quizá a factores nutricionales asociados a la dieta del animal. Se ha descrito también que ciertos mutantes alterados en señalización, como los mutantes *hog1* y *pbs2*, son sensibles a sales biliares (Prieto *et al.*, 2014) siendo incapaces de colonizar el tracto gastrointestinal, lo que sugiere la relevancia de la resistencia a sales biliares en la capacidad de colonización. La cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup>, sin embargo, no presenta sensibilidad a sales biliares tanto en ausencia como presencia de aCT (Figura 20), lo que descarta *a priori* este como uno de los mecanismos responsables.

Nuestros datos indican que la inducción de la filamentación mediante la adición de aCT conduce a una pérdida gradual de la colonización fúngica en intestino. Esta pérdida tiene lugar en 2-3 semanas y es independiente de la administración previa del derivado al animal. Nuestros datos coinciden en parte con los obtenidos por Vautier y cols. Estos autores han descrito que el uso de un mutante bloqueado en la forma filamentosa (*nrg1*) presenta tasas de colonización inferiores a una cepa silvestre (Vautier *et al.*, 2015), en torno a 10<sup>5-6</sup> CFUs/g heces, valores similares a los nuestros, obtenidos a los días 7 y 12 post inoculación. Estos mismos autores indicaron que un mutante *tup1* era capaz de colonizar a tasas cercanas a 10<sup>6</sup> CFUs/g en el día 10 tras la inoculación, valores claramente superiores a los mostrados por nuestro mutante en las condiciones ensayadas. Sin embargo, en este estudio no se extiende el ensayo durante días adicionales, de forma que aunque demuestran la mayor capacidad de adaptación de la

morfología levaduriforme, no puede concluirse de sus datos si la forma filamentosa es intrínsecamente incapaz de colonizar. Nuestros resultados demuestran inequívocamente que éste es el caso: la inducción de la forma hifal por disminución de *TUP1* no provoca una disminución del crecimiento (estimado mediante los datos de crecimiento en masa en cultivos creciendo en fase exponencial, datos no mostrados y (Braun, 1997)).

Podemos concluir, por tanto, que la forma levaduriforme de *C. albicans* es la que está más adaptada al crecimiento en el tracto gastrointestinal de ratón, al menos, en el modelo de comensalismo que hemos utilizado y la cepa utilizada.

## B. Papel del dimorfismo en la respuesta inmunitaria

Los microorganismos que habitan el intestino tiene un papel esencial en mantener un equilibrio que evite la proliferación de patógenos y el consecuente daño tisular (Zelante *et al.*, 2016). Las barreras físicas, diversos factores antimicrobianos y los anticuerpos son responsables de impedir los ataques al epitelio. La presencia de la microbiota intestinal tiene un papel evidente en la modulación de la actividad del sistema inmune, además de en la regulación de la actividad metabólica del hospedador (Hooper *et al.*, 2012; Neville *et al.*, 2015).

En los últimos años el estudio de la respuesta de tipo  $T_H17$  ha sido de especial importancia para conocer con mayor precisión el comensalismo de *C. albicans*. Este tipo de respuesta es esencial en la defensa frente al hongo, promoviendo el reclutamiento de neutrófilos (Laan *et al.*, 1999). La deficiencia en IL-17, la principal citoquina producida por los linfocitos  $T_H17$ , conlleva una mayor susceptibilidad a sufrir candidiasis (Conti *et al.*, 2009). Además, se han observado alteraciones en este tipo de respuesta en pacientes con infecciones por *Candida* (Eyerich *et al.*, 2008; Milner *et al.*, 2008). La transición dimórfica tiene especial importancia en la respuesta  $T_H17$ ; mientras que la forma levaduriforme no causa una respuesta inflamatoria significativa, las hifas inducen la producción de IL-1 $\beta$ , citoquina clave en la diferenciación de linfocitos  $T_H17$  (Cheng *et al.*, 2011; Hernandez-Santos *et al.*, 2012; Hise *et al.*, 2009; Joly *et al.*, 2009; Vautier *et al.*, 2015). Dicha respuesta es fundamental en el control del crecimiento del hongo en diferentes mucosas, como es el epitelio intestinal. La respuesta  $T_H17$ , por tanto, está relacionada con la colonización intestinal, y es especialmente inducida por el crecimiento filamentoso en el interior del intestino.

Vautier y colaboradores analizaron en profundidad la implicación de este tipo de respuesta en la colonización, a través de la inhibición de IL-1 $\beta$  durante este proceso. Esta inhibición no tuvo efecto alguno en los alojamientos en heces obtenidos tras colonizar con una cepa silvestre SC5314 y con el mutante hiperfilamentoso *nrg1*. Así mismo, emplearon ratones *knock out* para la interleuquina IL-17, y tras colonizarlos con un mutante cuya filamentación indujeron con doxiciclina, no detectaron diferencias en los niveles de

colonización en relación a los obtenidos en ratones silvestres. Por ello, y aunque son muchos los estudios que muestran cómo el comensalismo de *C. albicans* induce una respuesta de tipo  $T_H17$ , entre ellos este trabajo, aún no se conoce con precisión la relación entre la colonización intestinal y el desarrollo de dicha respuesta.

El análisis mediante RT-PCR de la expresión de distintas citoquinas en el colon de ratones colonizados ha mostrado cómo la inducción de la filamentación repercute en el tipo de respuesta inmunitaria generada (Figura 37). La filamentación de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> en el interior del intestino conlleva un aumento en los niveles de IL-17A e IL-22, lo cual indica la implicación de la respuesta  $T_H17$  en la colonización, tal y como han descrito varios autores (Rizzetto *et al.*, 2010; Vautier *et al.*, 2015). Este análisis también muestra cómo la inducción de la filamentación conlleva un aumento en los niveles de las citoquinas inflamatorias IL-10 y TNF- $\alpha$ , al tiempo que hemos observado que dicha inducción causa mayor daño en el colon de los ratones colonizados (Figura 36). Los altos niveles de dichas citoquinas inflamatorias parecen estar relacionados con el daño que la filamentación origina en el epitelio intestinal. En cambio, en ausencia de doxiciclina durante la colonización hemos observado un daño similar pocos días tras la inoculación, mientras que en los días posteriores no se observa daño alguno en la misma región del intestino. Por otro lado, el análisis mediante RT-PCR muestra niveles altos de la citoquina inflamatoria IL-6 en el inicio de la colonización, los cuales disminuyen en los días siguientes. Esto sugiere que la producción de citoquinas inflamatorias está relacionada con el daño en el epitelio intestinal.

Un segundo aspecto que hemos analizado es el estudio de la respuesta humoral producida durante la colonización intestinal, con el objetivo de profundizar y comprender en mayor medida la relación de comensalismo entre *C. albicans* y el hospedador. Este estudio lo hemos realizado usando técnicas proteómicas, ya que permiten un enfoque predictivo y preventivo en el caso de las infecciones microbianas (Weston *et al.*, 2004) y que nuestro grupo tenía experiencia previa. La inmunoproteómica de *C. albicans*, mediante electroforesis bidimensional seguida de *western blot* o espectrometría de masas, es una técnica eficiente y reproducible que ha permitido describir la respuesta serológica frente al hongo, tanto utilizando modelos animales como el suero de pacientes con candidiasis sistémica (Pitarch *et al.*, 2004; Pitarch *et al.*, 2001; Pitarch *et al.*, 2006).

En este trabajo hemos establecido dos tipos de modelos de colonización en ratón, uno de ellos combinado con una infección sistémica posterior, lo que supone una importante herramienta para estudiar la respuesta humoral inducida tras ambos procesos. Consideramos que el modelo de colonización previamente caracterizado en nuestro grupo es el más adecuado para este estudio, a pesar de que existen diferencias evidentes entre la microbiota murina y la del ser humano y de la ausencia de *C. albicans* en el intestino del ratón (Helstrom *et al.*, 1979; Kinneberg *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2014). El empleo de ratones inmunocompetentes, sin embargo, es un aspecto importante frente al uso de ratones inmunocomprometidos llevado a cabo en diversos estudios (Koh, 2013; Koh *et al.*, 2008), y es importante para caracterizar la respuesta inmunitaria humoral.

Los anticuerpos de tipo IgG son producidos en respuesta a la infección por hongos y son el tipo de inmunoglobulina más abundante en el suero, constituyendo aproximadamente el 80 % de los anticuerpos totales. Las IgG tienen así un papel fundamental en la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos (Feja *et al.*, 2005) debido a las diferentes funciones que realizan potenciando dicha respuesta.

El análisis del título de anticuerpos generado en cada situación (comensalismo (C), infección (I) y comensalismo seguido de infección (C+I)) indica una producción de anticuerpos significativamente mayor durante el curso de la colonización, en relación al título correspondiente a ratones sin colonizar. La combinación de colonización seguida de infección sistémica (C+I) incrementa el título de anticuerpos aproximadamente siete veces (Figura 44). Los altos títulos de anticuerpos correspondientes a una infección en ratones previamente colonizados sugieren que dichos animales desarrollan una fuerte respuesta mediada por anticuerpos tras el inicio de la infección sistémica. Resultados similares fueron descritos por Cutler y colaboradores al emplear una vacuna contra la candidiasis en ratones colonizados. Este grupo demostró la producción de anticuerpos específicos para manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* en ratones previamente colonizados además de en ratones que habían sido colonizados mediante transferencia horizontal del hongo. En este mismo estudio, tras llevar a cabo una inmunización con un péptido derivado de la proteína Fba1, comprobaron la abundante producción de anticuerpos específicos para dicha proteína, demostrando así su potencial uso como vacuna (Cutler *et al.*, 2011). Nuestros resultados también son consistentes con estudios previos que probaron la inducción de la respuesta mediada por anticuerpos en respuesta a la colonización por *C. albicans* (Ghaffari *et al.*, 2015). Por lo tanto, la utilización de los modelos descritos a lo largo de este trabajo utilizando con ratones inmunocompetentes, son los más idóneos para llevar a cabo el análisis de la respuesta humoral tanto durante la colonización como durante la infección sistémica.

En esta tesis hemos estudiado también la naturaleza de los anticuerpos en respuesta a una situación de comensalismo través de un análisis de tipo SERPA (*Serological Proteome Analysis*). Tras una larga exposición al hongo en el intestino (55 días), la composición (diversidad) de anticuerpos se mantiene, aunque los niveles de los mismos aumentan considerablemente a lo largo del tiempo. Es de destacar el elevado título de ciertos anticuerpos durante la colonización (frente a las proteínas Eno1, Met6, Hsp70, Pgk1 y Pdc11), así como el mantenimiento de títulos bajos durante el proceso, como frente a la chaperona Hsp90. En el modelo C+I, la composición del patrón de anticuerpos producido es similar, aunque presentando ciertas diferencias en anticuerpos frente a proteínas de tipo *heat shock*.

En la fase temprana de la colonización intestinal (día 10) se observan niveles bajos de anticuerpos frente a proteínas metabólicas como Pdc11, Pgk1, Met6 y Eno1, además de frente a proteínas inmunogénicas como Hsp90. En los días posteriores (días 25 y 55), este patrón de anticuerpos se mantiene aunque aumentan los títulos, especialmente frente a Eno1, Met6, Hsp70 y Pgk1, lo que refleja un aumento progresivo de la respuesta frente a colonización. Por otro lado, anticuerpos frente a ciertas proteínas como Cdc19 o Asc1 se

encuentran a bajos niveles y se detectan a tiempos largos durante la colonización, lo que sugiere la baja inmunogenicidad de dichas proteínas. La proteína Hxk2, por su parte, parece ser indicativa de una larga colonización (Figura 47).

Algunas de las proteínas detectadas durante la colonización ya han sido descritas como inmunogénicas en el transcurso de una infección sistémica, como Met6 o Hsp90 (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004b; Pitarch *et al.*, 2001). Estudios previos han descrito las ventajas del uso de anticuerpos frente a Hsp90 en el diagnóstico de la infección, dado que aquellos pacientes con altos niveles de este anticuerpo presentan un riesgo elevado de sufrir candidiasis invasivas (Pitarch *et al.*, 2014). Sin embargo, los niveles de anti-Hsp90 detectados en este trabajo son bajos durante la colonización intestinal. La inducción de estos anticuerpos en cantidades bajas podía estar destinada a proteger frente a una posible infección y al control del crecimiento del hongo durante la colonización del intestino.

Por otro lado, hemos obtenido patrones de anticuerpos muy diferentes al comparar la colonización con la infección sistémica. Aunque ambos patrones comparten la producción de anticuerpos frente a las proteínas Eno1, Cdc19, Hsp70, Pdc11 y Pgk1, durante la infección éstos se producen en una cantidad notablemente inferior, a excepción del anticuerpo frente a Pdc11, que muestra cierta relación específica con la infección sistémica, al igual que la reacción frente a Ssa2. Así mismo, durante este proceso no se detectan reacciones frente a Met6 o Hsp90, lo cual se podría justificar por la dosis subletal empleada (Figura 48). Ciertos estudios han analizado la respuesta mediada por anticuerpos tanto de pacientes con candidiasis como de pacientes sanos, describiendo diferencias en la reactividad que ambos presentan a proteínas de la superficie celular de *C. albicans*. Curiosamente, la gran mayoría de pacientes sanos muestran una producción de anticuerpos frente a proteínas de la superficie celular implicadas en filamentación y en virulencia, reflejando así la presencia de una respuesta inmunitaria por parte del hospedador (Mochon *et al.*, 2010).

Todos los ensayos realizados han mostrado un título alto de anticuerpos frente a la proteína metabólica Eno1, que además aumenta en el tiempo. Esta enzima citosólica y de pared es expresada en abundancia en varios organismos y se considera una proteína multifuncional, ya que presenta otras funciones además de ser un elemento clave en la glicolisis (Holland *et al.*, 1978; Kim *et al.*, 2005). Además, presenta un papel en la adhesión a células del hospedador, en la invasión de tejidos, en la formación de biopelículas y en la adaptación metabólica. De hecho, el tratamiento del epitelio intestinal con enolasa bloquea la adhesión del hongo (Jong *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2014) por lo que se considera un antígeno inmunodominante. La alta reactividad frente a Eno1 ha sido descrita también en sueros obtenidos de pacientes con candidiasis invasivas (Pitarch *et al.*, 2014). Tanto Eno1 como Fba1 son proteínas expresadas en la superficie celular de *C. albicans* durante su transición dimórfica (Pitarch *et al.*, 2006). Esta localización facilita la producción de anticuerpos específicos de ambas durante la infección (Li *et al.*, 2013; Montagnoli *et al.*, 2004; Pitarch *et al.*, 2002). Su contribución a la patogenicidad del hongo es distinta de la que presentan proteínas inmunogénicas como Fba1 (Pitarch *et al.*, 2014).



La localización de proteínas implicadas en estrés térmico (como Hsp70, Hsp90, Ssa1 y Ssa2) en la pared celular de *C. albicans* ha sido previamente descrita (Lopez-Ribot *et al.*, 1996; Nombela *et al.*, 2006; Pitarch *et al.*, 2002). Dicha localización es de gran relevancia en la interacción con anticuerpos y en el reconocimiento por parte de éstos. La elevada inmunogenicidad de la proteína Hsp70 (Bromuro *et al.*, 1998) podría justificar los altos niveles de IgG detectados en ratones colonizados. Una de las diferencias más interesantes entre los dos ensayos de colonizados realizados es la ausencia total de Hsp90 en el modelo C+I. Estudios previos han descrito una relación directa entre la presencia de anticuerpos anti-Hsp90 en sueros de pacientes y el elevado riesgo de sufrir candidiasis invasivas, en relación con aquellos pacientes que presentan menores concentraciones, demostrando así la ventaja de este análisis en el diagnóstico (Pitarch *et al.*, 2014). La proteína Hsp90 es una diana esencial en la producción de anticuerpos protectores en una candidiasis. Además, los pacientes con candidiasis diseminada presentan anti-Hsp90, a diferencia de aquellos que sufren lesiones superficiales o localizadas (Matthews *et al.*, 1988; Porsius *et al.*, 1990; Weis *et al.*, 1997). Otros estudios recientes han descrito que Hsp90 también está implicada en la resistencia de *C. albicans* a equinocandinas, manifestando así la versatilidad biológica de dicha proteína (Bugli *et al.*, 2013).

Por otro lado, únicamente en el modelo C+I se detectó una fuerte respuesta frente a la proteína Ssa2 (Figura 49), la más abundante en la familia de proteínas de tipo Hsp70 y proteína de unión a histatinas de origen humano (Li *et al.*, 2003). También está implicada en la adhesión a células epiteliales y endoteliales y en endocitosis (Hasin *et al.*, 2014; Modrzewska *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010). La presencia de anticuerpos frente a Ssa2 durante la colonización, por tanto, prevendría al hongo de histatinas al tiempo que limitaría su adhesión y endocitosis.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, una idea atractiva es que durante la colonización en el modelo descrito, el sistema inmunitario del hospedador induzca específicamente ciertos anticuerpos frente a proteínas de choque térmico con objeto de limitar y controlar la colonización de *C. albicans*. Algunas de las proteínas detectadas durante la colonización (Met6, Eno1 y Pgk1) también han sido descritas como inmunogénicas (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004b; Pitarch *et al.*, 2001), así como útiles en el diagnóstico de candidiasis invasivas (Pitarch *et al.*, 2008; Pitarch *et al.*, 2007, 2014, 2016). La detección de anticuerpos frente a enzimas glicolíticas como Eno1, Pgk1, Cdc19, Fba1 y Hxk2 refleja la importancia de esta ruta en la flexibilidad metabólica de *C. albicans* y otros patógenos en su intento por colonizar ciertos nichos del hospedador (Askew *et al.*, 2009).

La detección de una fuerte respuesta humoral frente a la enolasa en estos modelos de colonización se corresponde con estudios previos que describen unos títulos elevados de anticuerpos frente a Eno1 en individuos con candidiasis invasivas (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004a, 2004b; Pitarch *et al.*, 2008; Pitarch *et al.*, 2014). Tanto Eno1 como Fba1 son proteínas ampliamente caracterizadas y localizadas en la pared celular tanto de blastosporas como de hifas de *C. albicans* (Pitarch *et al.*, 2002). Su localización en la superficie celular, por tanto, facilita la producción de anticuerpos por parte del hospedador

(Li *et al.*, 2013; Montagnoli *et al.*, 2004; Pitarch *et al.*, 2002). La enolasa es una proteína metabólica y una de las enzimas citosólicas más abundantes (Holland *et al.*, 1978), es considerada una proteína multifuncional y un antígeno inmunodominante (Angiolella *et al.*, 1996) y presenta una expresión génica variable en el curso de la infección (He *et al.*, 2015).

La respuesta humoral obtenida en los dos modelos de colonización empleados también se ha comparado con aquella generada tras una infección sistémica. La administración de una dosis subletal en este modelo se ha aplicado en otros estudios con el fin de generar una infección crónica, lo cual permite el análisis posterior del alojamiento fúngico en los principales órganos diana, especialmente el riñón (Papadimitriou *et al.*, 1986). Dado que se trata de una dosis baja, los títulos de anticuerpos producidos son relativamente bajos, algo esperado por estudios previos (Diez-Orejas *et al.*, 1997).

Al establecer una comparación entre el patrón de anticuerpos detectados en ratones colonizados e infectados hemos detectado ciertas diferencias, tal y como se muestran en la Tabla 1. Estos resultados reflejan la capacidad que posee el sistema inmunitario para diferenciar entre colonización intestinal e infección sistémica. Los patrones correspondientes a ambos modelos comparten algunos anticuerpos frente a enzimas glicolíticas (Eno1 y Pgk1), otras enzimas metabólicas (como Pdc11) y dos proteínas de la familia de Hsp70.

En los últimos años se ha profundizado en el conocimiento del papel protector de los anticuerpos frente a candidiasis. Se han desarrollado vacunas basadas en anticuerpos monoclonales que han demostrado proteger frente a una infección posterior. El uso de péptidos de la proteína Fba1 como vacuna, por ejemplo, induce la producción de anticuerpos específicos que prolongan la supervivencia de ratones infectados (Xin *et al.*, 2011). Además, los sueros obtenidos de ratones infectados inhiben el crecimiento de *C. albicans in vitro* (Zhang *et al.*, 2011). Por tanto, los anticuerpos no sólo pueden proteger al hospedador, sino que mantienen bajo control el crecimiento del hongo. Mediante genética reversa usando anticuerpos monoclonales frente a  $\beta$ -manósidos, se ha demostrado que el uso de un conjugado disacárido-albúmina permite disminuir el alojamiento fúngico en órganos diana (Bundle *et al.*, 2012). Los elementos que componen la superficie celular de *C. albicans*, como hemos comentado anteriormente, son buenos candidatos para el desarrollo de anticuerpos recombinantes. La administración de anti-manano, por ejemplo, ha mostrado su capacidad de protección mediante el aumento del tiempo de supervivencia del ratón y la disminución de los valores de alojamiento en riñones (Nishiya *et al.*, 2015). Los anticuerpos no sólo han evidenciado su capacidad de protección durante el curso de una infección sistémica, sino también frente a candidiasis vaginal, mediante la administración de anticuerpos específicos para manano y para la aspartil proteasa Sap2 (De Bernardis *et al.*, 2015; De Bernardis *et al.*, 1997).

Con el fin de profundizar el posible papel de la colonización intestinal de *C. albicans* en una potencial protección frente a una infección sistémica, hemos empleado de nuevo los dos modelos de colonización anteriormente descritos (en solitario y seguida de una



infección) (Figura 51). La presencia de un elevado título de anticuerpos en el suero obtenido de ratones colonizados e infectados sugiere que dichos animales son capaces de desarrollar una fuerte respuesta inmunitaria frente a esta infección, lo cual también concuerda con la habilidad de responder a una vacuna frente a candidiasis (Cutler *et al.*, 2011). La especificidad de ciertos anticuerpos podría estar implicada, por tanto, en la protección frente a candidiasis mucosa y sistémica.

Posteriormente hemos llevado a cabo un ensayo de protección (similar a vacunación) en ratones colonizados, de forma similar a otros experimentos previamente descritos (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004a, 2004b). Nuestros resultados muestran cómo aquellos ratones anteriormente colonizados pueden generar una protección significativa frente a una infección letal posterior. En el caso de ratones previamente colonizados e infectados, pudimos detectar cierta protección aunque ligeramente menor (Figura 52). Estos resultados ponen de manifiesto cómo dichos ratones, a pesar de haber sido infectados con una dosis subletal, aún son capaces de generar cierta protección.

Nuestros resultados muestran que los ratones previamente colonizados con el hongo generan protección frente a una infección sistémica letal. Esta protección también se observa en ratones ya colonizados e infectados con una dosis subletal, aunque en menor medida debido a la infección crónica previa. Aun así, estos animales también muestran signos de cierta protección.

Por otra parte, los títulos significativamente altos que muestran los sueros obtenidos en el ensayo “C+I” parecen indicar que la colonización previa podría suponer una ventaja ante una infección posterior. En el estudio de la composición de los diferentes sueros obtenidos hemos identificado varias proteínas inmunogénicas que podrían ser empleadas en el desarrollo de vacunas en el futuro. Algunas de ellas ya han mostrado capacidad de generar protección en estudios previos, como Fba1 (Xin *et al.*, 2011) o Eno1 (Li *et al.*, 2011; Montagnoli *et al.*, 2004; van Deventer *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta estos datos, aquellos ratones vacunados con Eno1 mostraron mayor porcentaje de supervivencia que aquellos no vacunados (Li *et al.*, 2011). Por otro lado, también se han empleado vacunas sintéticas con las proteínas Fba1, Met6, Hwp1, Eno1, Tdh3 y Pkg1 (Xin *et al.*, 2011; Xin *et al.*, 2008).

Este trabajo apoya la idea de que los microorganismos con un posible papel en la homeostasis intestinal y la inflamación tienen una importante implicación en la respuesta generada por el hospedador. La extrapolación de los resultados obtenidos con ratones en esta tesis a seres humanos podría ser de especial relevancia si consideramos que *C. albicans* forma parte de la microbiota y su posible implicación en el inicio de procesos inflamatorios.

## Conclusiones

---



1. La obtención de una cepa de *Candida albicans* en la que la expresión del regulador transcripcional *TUP1* depende del sistema de expresión controlado por tetraciclinas (*TUP1*<sup>REP</sup>) es una herramienta eficaz para estudiar el crecimiento filamentoso de este hongo, tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. El empleo de clortetraciclina autoclavada (aCT) como sustitución de la doxiciclina en estudios de patogénesis fúngica, añade versatilidad al sistema de regulación mediado por tetraciclina en estudios *in vivo*. La administración oral de aCT en ratones permite regular eficazmente la morfología celular de la cepa *TUP1*<sup>REP</sup> durante el curso tanto de una colonización como de una infección sistémica.
3. La inducción del crecimiento filamentoso en *C. albicans* por represión de la expresión de *TUP1* provoca una diferente sensibilidad a ciertos antifúngicos y compuestos que dañan la pared y la membrana celular del hongo, lo que sugiere cambios en dichas estructuras.
4. La inducción de la filamentación por represión del regulador *TUP1* provoca una disminución en la capacidad de adhesión a superficies abióticas y epitelio intestinal de ratón así como una mayor resistencia ante la actividad fungicida de neutrófilos y macrófagos murinos y un aumento de la producción de IL-17A por parte de neutrófilos.
5. La inducción del crecimiento filamentoso mediado por *TUP1* en un modelo de comensalismo gastrointestinal en ratones C57BL/6, provoca una disminución de la colonización fúngica que conduce a su eliminación. Dicho crecimiento filamentoso causa un aumento significativo en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-17A en el colon de ratones colonizados.
6. El análisis de la composición de suero obtenido durante la colonización gastrointestinal en ratones C57BL/6 revela la presencia de una fuerte respuesta inmunitaria humoral. Se detecta un elevado título de anticuerpos frente a las proteínas Eno1, Met6, Hsp70, Pgc1 y Pdc11 desde el comienzo de la colonización, mientras que a tiempos largos aparecen anticuerpos específicos frente a las proteínas Hxk2, Cdc19 y Asc1. Sin embargo, los títulos frente a la chaperona Hsp90 se mantienen relativamente bajos durante el curso de la colonización.
7. El patrón diferencial de anticuerpos detectado por inmunoproteómica pone de manifiesto la capacidad del sistema inmunitario para diferenciar entre colonización intestinal e infección sistémica. Ambos modelos sólo comparten algunos anticuerpos frente a enzimas glicolíticas y metabólicas como Eno1, Pgc1 y Pdc11, así como frente a dos proteínas de la familia de Hsp70.
8. La colonización del tracto gastrointestinal por *C. albicans* en ratones C57BL/6 protege parcialmente frente a una infección sistémica letal posterior, sugiriendo que durante la colonización se desarrolla una respuesta inmunitaria protectora.



# Materiales y Métodos

---



## 1. Tipos celulares

### A. Microorganismos

Los microorganismos empleados en este trabajo y las distintas cepas se detallan en la tabla 2. La bacteria *E. coli* se ha usado para la obtención y posterior amplificación de plásmidos utilizados en la transformación de cepas de *C. albicans*.

MICROORGANISMO	CEPA	GENOTIPO	NOMENCLATURA EN TEXTO Y FIGURAS	REFERENCIA
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$ F'	<i>K12<math>\Delta</math> (lacZYA-argF)<sub>U169</sub> supE44 thi1 recA1 endA1 hsdR17gyr A relA1 (ø80lacZ<math>\Delta</math>M15) F'</i>		(Hanahan, 1983)
<i>C. albicans</i>	SC5314	Silvestre	wt (SC5314)	(Gillum et al., 1984)
<i>C. albicans</i>	CAF2	<i>ura3<math>\Delta</math>::imm434/ura3<math>\Delta</math>::imm434-URA3</i>	wt (CAF2)	(Fonzi et al., 1993)
<i>C. albicans</i>	HI3-21	<i>[CAI-4] hog1::hisG/hog1::hisG-URA3-hisG</i>	<i>hog1</i>	(Prieto et al., 2014)
<i>C. albicans</i>	COA6-3	<i>[CAF2] ADH1/adh1::tTA pTET- GFP -SAT1</i>	CAF2-GFP <sup>REP</sup>	(Prieto et al., 2014)
<i>C. albicans</i>	PAP1	<i>[CAF2] ADH1/adh1::rtTA pTET- GFP -SAT1</i>	CAF2-GFP <sup>IND</sup>	(Prieto et al., 2014)
<i>C. albicans</i>	PPD7	<i>[CAF2] ADH1/adh1::tTA pTET RFP -SAT1</i>	CAF2-RFP <sup>REP</sup>	(Prieto et al., 2014)
<i>C. albicans</i>	BCa2-10	<i>[CAI-4] tup1::hisG-URA3-hisG/tup1::hisG</i>	<i>tup1</i>	(Braun, 1997)
<i>C. albicans</i>	TUP1 <sup>REP</sup>	<i>[tup1] ADH1/adh1::tTA pTET TUP1-URA3</i>	TUP1 <sup>REP</sup>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	TUP1 <sup>IND</sup>	<i>[tup1] ADH1/adh1::rtTA pTET TUP1-URA3</i>	TUP1 <sup>IND</sup>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	TUP1 <sup>REP</sup> -RFP	<i>[tup1] ADH1/adh1::tTA pTET TUP1-URA3 ARD1/ard1::pACT RFP-SAT1</i>	TUP1 <sup>REP</sup> -RFP	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	TUP1 <sup>IND</sup> -RFP	<i>[tup1] ADH1/adh1::rtTA pTET TUP1-URA3 ARD1/ard1::pACT RFP-SAT1</i>	TUP1 <sup>IND</sup> -RFP	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup>	<i>[tup1] ADH1/adh1::tTA pTET TUP1-URA3 ARD1/ard1:: tTA pTET RFP SAT1</i>	TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup>	Este trabajo

**Tabla 2. Cepas de microorganismos empleadas**



## B. Líneas celulares

Las líneas de células de mamífero utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 3.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	UTILIDAD	REFERENCIA
Neutrófilos	Peritoneo de ratón (C57BL/6)	Ensayos de actividad fungicida y fagocítica	Cultivo primario
RAW 264.7	Macrófagos murinos derivados de monocito	Ensayos de actividad fungicida y fagocítica	ATCC TIB-71

**Tabla 3. Líneas celulares empleadas**

## 2. Animales de experimentación

Los diferentes experimentos con animales se han llevado a cabo en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (Campus de Moncloa) y todos los procedimientos realizados han sido previamente aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal.

Todos los experimentos fueron realizados con ratones hembra C57BL/6J (B6) procedentes de Harlan Laboratories y de 6 a 8 semanas de edad, a excepción de los ratones utilizados para la obtención de neutrófilos de la cavidad peritoneal, en cuyo caso la edad aproximada fue de 20 semanas.

El ensayo de colonización destinado a obtener cortes histológicos del intestino y el patrón de citoquinas expresadas fue realizado en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Perugia (Italia). Se emplearon ratones hembra C57BL/6J (B6) de 8 a 10 semanas de edad procedentes de Charles River (Calco, Italia). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Cuidado Animal de la Universidad de Perugia.

## 3. Manipulación de estirpes celulares

### A. Microorganismos

#### a) Medios de cultivo

Los medios de cultivo para crecimiento de bacterias y levaduras se utilizaron tanto en forma líquida como sólida, a los que se añade un 2 % peso/volumen (p/v) de agar. El agua utilizada para su disolución fue desionizada mediante sistemas de purificación Millipore, siendo posteriormente esterilizados en autoclave (121 °C, 22 min). La composición de los

medios de cultivo se detalla en la tabla 4. Los compuestos añadidos a los medios de cultivo para estudios específicos se resumen en la tabla 5.

MEDIO	COMPOSICIÓN	UTILIDAD	REFERENCIA
LB	1 % bactotripton, 0.5 % extracto de levadura y 0.5 % NaCl	Medio rico utilizado para el crecimiento de bacterias. (La adición de ampicilina o cloranfenicol 100 mg/L se realizó para la selección de transformantes portadores del plásmido que contiene el gen de resistencia al antibiótico correspondiente).	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
YPD	1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % de glucosa	Medio completo para el cultivo de levaduras. La adición de nourseotricina 200 mg/L se realizó para la selección de transformantes portadores del gen de resistencia a dicho antibiótico.	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
YPD suero	Suero fetal bovino estéril (BioWhittaker, Bélgica)	Medio inductor de la filamentación en <i>C. albicans</i>	(Gow <i>et al.</i> , 1982)
MM Ura-	2 % glucosa, 0.17 % base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 0.5 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Medio selectivo para transformantes portadores del marcador URA3.	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
SD	2 % glucosa, 0.17 % base nitrogenada para levaduras, 0.5 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 0.19 % de mezcla de aminoácidos.	Medio de composición definida empleado para el crecimiento de levaduras de forma rutinaria.	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
RPMI 1640	Medio rico en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa.	Preincubación de <i>C. albicans</i> en ensayos de adhesión <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> .	(BioWhittaker, Bélgica)

**Tabla 4. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de microorganismos**

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	UTILIDAD Y CARACTERÍSTICAS
Ampicilina	100 $\mu\text{g/mL}$	Selección de transformantes que porten resistencia a dicho antibiótico.
Cloranfenicol	20 $\mu\text{g/mL}$	Selección de transformantes que porten resistencia a dicho antibiótico en <i>E. coli</i> . Crecimiento selectivo de <i>C. albicans</i> a partir de heces de ratón.
Nourseotricina	200 $\mu\text{g/mL}$	Antibiótico empleado para la selección de los transformantes portadores de dicho gen de resistencia.
Rojo Congo	50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ en medio sólido	Se une a quitina e inhibe la síntesis de $\beta$ -(1,3)-glucano <i>in vitro</i> .

Blanco de Calcoflúor	12 y 24 µg/mL	Compuesto que interfiere en la correcta cristalización de las moléculas de quitina.
Caspofungina	50 y 100 µg/mL	Inhibidor de la síntesis de β-(1,3)-glucano.
Sales biliares	0,05 y 0,1 %	Sales con efecto emulgente que alteran la membrana celular.
SDS	0,01 y 0,05 %	Detergente que altera la membrana celular.
Sorbitol	1 y 2 M	Compuestos que aumentan la osmolaridad externa.
Cloruro sódico	1 y 1,5 M	
Cloruro potásico	1 y 1,5 M	
Suero fetal bovino estéril	10 %	Medio inductor de la filamentación en <i>C. albicans</i> .
Doxiciclina	20 µg/mL	Antibiótico empleado para regular el promotor OP4 en los plásmidos que lo contienen.
Clortetraciclina	20 µg/mL <i>in vitro</i> 1 mg/mL <i>in vivo</i>	Antibiótico empleado para regular el promotor OP4.
Miconazol	0,6 y 1,25 µg/mL	Antifúngicos de tipo azol que afecta a la funcionalidad de la membrana.
Fluconazol	2 y 4 µg/mL	
Anfotericina B	1 y 1,5 µg/mL	Antifúngico poliénico que afecta a la funcionalidad de la membrana.

**Tabla 5. Compuestos adicionales empleados para ensayos específicos**

### b) Ensayos de sensibilidad en placa

Los ensayos de resistencia/sensibilidad de algunas cepas de *C. albicans* a determinados compuestos se realizaron en medio sólido y a partir de cultivos en fase estacionaria del crecimiento, preparándose suspensiones a densidad óptica 0.8 (1 unidad de D.O. equivale a  $2.5 \times 10^7$  células/mL) y realizándose diluciones decimales para finalmente depositar una gota de cada una, mediante el uso de un replicador, en placas suplementadas con el compuesto en estudio.

### c) Uso de clortetraciclina inactivada por calor

La clortetraciclina (Sigma) se inactivó parcialmente por calor mediante autoclave (121 °C, 22 min) disuelta en agua a una concentración de 1 mg/mL. Posteriormente fue filtrada en esterilidad a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm para eliminar los restos de precipitados como consecuencia del calor.

Para los experimentos *in vivo*, la concentración empleada fue de 1 mg/mL, mientras que para los ensayos *in vitro* fue de 20 µg/mL.

#### d) Estudios de adhesión y cuantificación de la filamentación *in vitro*

Los ensayos de adhesión a plástico se realizaron en placas de 24 pocillos. Se analizó la capacidad de adhesión de un total de  $10^7$  células por pocillo en un volumen de 2 mL de medio RPMI completo e incubadas en una estufa de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. La aCT se añadió al medio, cuando fue necesario, en una concentración de 20 µg/mL. Todas las condiciones fueron hechas por triplicado y a diferentes tiempos (45, 90 y 180 minutos). Así mismo, para cada tiempo se testaron dos placas en idénticas condiciones. Tanto el recuento de células no adheridas como el de adheridas (recuperadas mediante rascador) fue realizado por siembra de varias diluciones y conteo de CFUs. De esta manera, se obtuvo el porcentaje de adhesión en cada caso:

$$\% \text{ Adhesión} = \frac{\text{adheridas}}{(\text{adheridas} + \text{no adheridas})} \times 100$$

El porcentaje de filamentación de cada condición del experimento se realizó seleccionando al microscopio óptico un campo homogéneo, contando las células totales y determinando el porcentaje de células levaduriformes y de hifas.

#### e) Estudios de adhesión *ex vivo* a epitelio intestinal

Los ensayos de adhesión *ex vivo* se llevaron a cabo sobre porciones de intestino grueso de aproximadamente 1 cm de longitud procedentes de ratones C57BL/6 no tratados. Se usaron dos piezas de metacrilato con un orificio en el centro, de manera que la región del lumen del intestino previamente lavado con PBS quedaba expuesta al exterior a través de dicho orificio.

Previamente a la interacción con el intestino, la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> creció en medio YPD y a 37 °C durante 16 horas. A continuación las células fueron lavadas y reinoculadas en medio RPMI completo (con y sin aCT a 20 µg/mL) a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL. Tras 2 horas de incubación en estas condiciones, se tomó un volumen de 50 µl (equivalente a 100000 células teóricamente) y se homogeneizó con el mismo volumen de células de la cepa CAF2 (empleada como control interno) obtenidas en idénticas condiciones. La muestra de ambas cepas en proporción 1:1 se depositó sobre la porción de intestino y se mantuvo la interacción durante 180 minutos a 37 °C.

Las dos cepas de interés estaban marcadas con GFP y RFP respectivamente, lo cual permite el recuento de CFUs al final del experimento, ya que el marcaje repercute en el color verde o rojo de las colonias y posibilita la identificación de cada cepa.

Tras el tiempo de interacción se separaron las piezas de metacrilato, se lavó el intestino con PBS repetidas veces y se recortó el tejido sobrante para continuar únicamente con la parte ensayada. Dicha región fue disgregada y homogeneizada al máximo en PBS. Se

realizaron varias diluciones para siembra y recuento de CFUs, tanto de la región de intestino como de los inóculos iniciales. De esta manera, el porcentaje final de adhesión de cada cepa se realiza en función del número de células iniciales. El IRA (Índice Relativo de Adhesión) de cada una de las cepas se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{IRA} = \frac{\% \text{ Adheridas}}{\% \text{ Iniciales}} = \frac{\frac{\text{Adheridas de X}}{\text{Adheridas totales}} \times 100}{\frac{\text{Iniciales de X}}{\text{Iniciales totales}} \times 100}$$

## B. Líneas celulares

### a) Medios de cultivo

Todos los experimentos de actividad fagocítica llevados a cabo con las diferentes líneas celulares fueron realizados en medio RPMI 1640 (BioWhittaker, Bélgica), medio rico en aminoácidos, vitaminas, glucosa y sales inorgánicas, al cual se le añadieron antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1 %), FBS al 10 % y L-Glutamina (RPMI completo).

Todas las líneas celulares se incubaron en estufas de cultivos celulares a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa controlada.

### b) Estudios de actividad fagocítica y fungicida

#### b.1. Macrófagos

La línea RAW 264.7 de macrófagos se mantuvo rutinariamente en medio RPMI completo en frascos (*flask*) de 75 cm<sup>2</sup> hasta la generación de una monocapa confluyente de células y reemplazando el medio de cultivo cada 2-3 días.

En los ensayos de fagocitosis realizados, la cepa fúngica fue incubada previamente en medio líquido YPD a 37 °C durante 16 horas. Las células fueron lavadas, reinoculadas en medio RPMI (con y sin aCT a 20 µg/mL) e incubadas durante 2 horas a 37 °C. Los macrófagos fueron incubados 16 horas antes en dicha placa a una concentración de 5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo. La densidad celular viable se determinó en el momento previo a la interacción mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se depositaron el mismo número de células (MOI 1:1) de *Candida* sobre cada pocillo (aproximadamente 10<sup>5</sup> células). La interacción entre ambos tipos celulares se mantuvo durante 45 y 90 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron tres ensayos independientes en idénticas condiciones y analizando cada muestra por sextuplicado. Finalmente, el contenido de cada pocillo fue recuperado y analizado mediante citometría de flujo, basándonos en el tamaño de los

macrófagos y el marcaje fluorescente de la cepa fúngica. Para ello y como control, se analizó en idénticas condiciones cada tipo celular por separado.

El análisis de la capacidad fungicida de macrófagos se llevó a cabo en las mismas condiciones de cultivo, a una MOI de 1:1 y durante 90 minutos. Los porcentajes de muerte se calcularon por siembra en medio sólido YPD de varias diluciones de los cultivos recuperados de cada pocillo y posterior recuento de CFUs. Como control, se realizó el recuento de varios pocillos en los que se había incubado *Candida* en ausencia de macrófagos en idénticas condiciones.

Para la cuantificación de la actividad fagocítica se empleó un citómetro Guava EasyCyte (Millipore) y su programa InCyte.

### **b.2. Neutrófilos**

Los neutrófilos fueron obtenidos de ratones de 20 semanas de edad tras una inyección peritoneal previa (4 horas) de 1 ml de tioglicolato. La densidad celular viable se determinó mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Para el análisis de la fagocitosis, se llevó a cabo la interacción entre  $10^5$  células de la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> y neutrófilos a una MOI de 1:1 en medio RPMI completo. Debido a que estos estudios fueron realizados durante una estancia en otro grupo de investigación, se empleó doxiciclina en lugar de aCT para suplementar el medio RPMI a una concentración de 20 µg/mL. Tras incubar las células a 37 °C durante 1 hora, fueron teñidas con Giemsa y observadas al microscopio. El recuento de células fagocitadas en un campo homogéneo de la muestra permitió determinar el porcentaje de fagocitosis.

La determinación del porcentaje de muerte se realizó en las mismas condiciones de cultivo y durante 2 horas mediante la siembra en medio sólido YPD y el recuento de CFUs. Como control, se realizó el recuento de varios pocillos en los que se había incubado *Candida* en ausencia de neutrófilos en idénticas condiciones.

## **4. Técnicas de Biología Molecular y Manipulación de DNA**

Los procedimientos de manipulación de DNA, como son el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*, la electroforesis de DNA en geles de agarosa, las reacciones de PCR, la determinación de la pureza y concentración de DNA, etc., se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos estándar. *E. coli* se transformó de manera rutinaria según el protocolo Hanahan (Hanahan, 1983).

Para llevar a cabo la integración en *C. albicans* de construcciones genéticas se siguió el sistema de transformación desarrollado por Köhler y colaboradores (Köhler *et al.*, 1996), que se basa en un tratamiento químico de la pared celular seguido de un choque eléctrico por electroporación.

## A. RT-PCR

Para el análisis de los niveles de citoquinas secretadas por neutrófilos, se incubaron las células de *Candida* con los neutrófilos a una MOI de 1:1 ( $10^5$  células de ambos tipos) durante 16 horas y a 37 °C y 5 % de humedad controlada. Los cultivos fueron recuperados y la extracción de RNA se realizó usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Para el análisis de los niveles de citoquinas secretadas durante la colonización gastrointestinal, se extrajo el colon de dos grupos de ratones colonizados, (uno de ellos tratado con doxiciclina desde el inicio del experimento) tras 5 y 12 días de colonización. La extracción de RNA se realizó usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) para homogeneizar la región del colon y siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

El RNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. La síntesis de cDNA a partir del RNA obtenido se llevó a cabo usando el *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad).

Las reacciones de PCR a tiempo real fueron preparadas usando el *iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit* (Bio-Rad) y realizadas en un aparato Mx3000P qPCR System (Stratagene). Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado y fueron normalizadas según los niveles de la enzima Gapdh empleando el software MxPro. Todos los análisis por RT-PCR fueron realizados en la Universidad de Perugia (Italia).

## B. Plásmidos y oligonucleótidos empleados

Los plásmidos utilizados y generados en este trabajo se recogen en la tabla 6. Los cebadores diseñados y empleados para este trabajo se detallan en la tabla 7.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pGEM-T	ori bla lacZ	Promega
pDS-RFP-HA	bla ARD1Pr ca-tTA SAT1 OP4-TetOPr RFP ARD1Term	Daniel Prieto
pNIM1R-URA3-RFP	bla ADH1Pr ca-tTA URA3 OP4-TetOPr RFP ADH1Term	Daniel Prieto
pNIM1R-URA3-TUP1	bla ADH1Pr ca-tTA URA3 OP4-TetOPr TUP1 ADH1Term	Este trabajo
pNIM1-URA3-TUP1	bla ADH1Pr ca-rtTA URA3 OP4-TetOPr TUP1 ADH1Term	Este trabajo
pNIM1-RFP	bla ADH1Pr ca-rtTA URA3 OP4-TetOPr RFP ADH1Term	Daniel Prieto

**Tabla 6. Plásmidos empleados y generados en este trabajo**

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5'-3'	GEN AMPLIFICADO
TUP1 upper	GATCTCGAGTATGTATCCCCAACGCACCC	TUP1
TUP1 lower	ATCGCGGCCGCGATTTTTTGGTCCATTTCCAAATTC	
GAPDH upper	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GAPDH

GAPDH lower	ACACATTGGGGGTAGGAACA	
IL-6 upper	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	IL-6
IL-6 lower	TCCACGATTTCCCAGAGAAC	
IL-10 upper	CCCTTTGCTATGGTGTCTT	IL-10
IL-10 lower	TGGTTTCTCTTCCCAAGACC	
IL-17A upper	GACTACCTCAACCGTTCCAC	IL-17A
IL-17A lower	CCTCCGCATTGACACAGC	
IFN- $\gamma$ upper	ACTGGCAAAGGATGGTGAC	IFN- $\gamma$
IFN- $\gamma$ lower	TGAGCTCATTGAATGCTTGG	
IL-22 upper	TTGAGGTGTCCAACTTCCAGCA	IL-22
IL-22 lower	AGCCGGACGTCTGTGTTGTTA	
TNF- $\alpha$ upper	GCCTCTTCTCATTCTGCTTG	TNF- $\alpha$
TNF- $\alpha$ lower	CTGATGAGAGGGAGGCCATT	

**Tabla 7. Oligonucleótidos empleados**

## C. Descripción del sistema de regulación por tetraciclina

Las construcciones genéticas empleadas para la obtención de cepas de *Candida albicans* de filamentación controlada están basadas en el sistema de expresión dependiente de tetraciclina, descrito por primera vez en 1992. El represor Tet (TetR) es originario de *Escherichia coli*, y su fusión con la proteína VP16 del virus *Herpes simplex* dio lugar a un trans-activador reprimible por tetraciclina (tTA). Su eficiencia fue confirmada en células HeLa, en las que se observó la expresión de luciferasa y su correspondiente represión a concentraciones crecientes de tetraciclina (Gossen *et al.*, 1992).

Actualmente se continúa usando este sistema de represión por doxiciclina (Dox<sup>REP</sup>) aunque también se han realizado diversas modificaciones para aumentar su versatilidad. La fusión de una versión reversa de TetR (rTetR) al dominio de activación supone una versión inducible de este sistema, ya que el antibiótico induce la unión de rTetR al operador (tetO), permitiendo sólo así la expresión del gen de interés (Dox<sup>IND</sup>) (Eckert *et al.*, 2009).

En nuestro laboratorio se ha usado este sistema de regulación por tetraciclina con éxito en gran variedad de ensayos. El plásmido pNIM1R (basado en el sistema Dox<sup>REP</sup>) nos fue cedido por la Dra. Leah E. Cowen (*Department of Molecular Genetics, University of Toronto*) y el plásmido pNIM1-GFP (sistema Dox<sup>IND</sup>) (Park & Morschhäuser, 2005) fue cedido por el grupo del Dr. Joachim Morschhäuser (*Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg*).

En ambos plásmidos el trans-activador está expresado por el promotor constitutivo ADH1. El promotor está compuesto por un derivado del promotor OP4 (al que nos referiremos



como promotor TET) con siete repeticiones de la secuencia tetO (Park & Morschhauser, 2005). La construcción contiene el promotor y la secuencia terminadora del gen *ADH1* (alcohol deshidrogenasa), con el objetivo de integrar la secuencia de interés por recombinación homóloga en el locus de dicho gen en el genoma de *C. albicans*.

## a) Obtención de cepas de filamentación controlada

### a.1. Construcción de TUP1<sup>REP</sup>

El gen *TUP1* fue amplificado por PCR empleando los oligonucleótidos previamente diseñados y DNA genómico de la cepa SC5314 de *C. albicans* como molde. La incorporación de secuencias de reconocimiento por enzimas de restricción (*Sal* I y *Not* I) en los cebadores permitió su introducción en el plásmido de interés.

La secuencia de *TUP1* fue insertada en el plásmido pNIM1R-URA3-RFP, el cual fue digerido con las enzimas de restricción *Sal* I y *Not* I para liberar el fragmento correspondiente a RFP. El inserto correspondiente a *TUP1* fue unido con el vector, obteniendo el plásmido pNIM1R-URA3-TUP1.

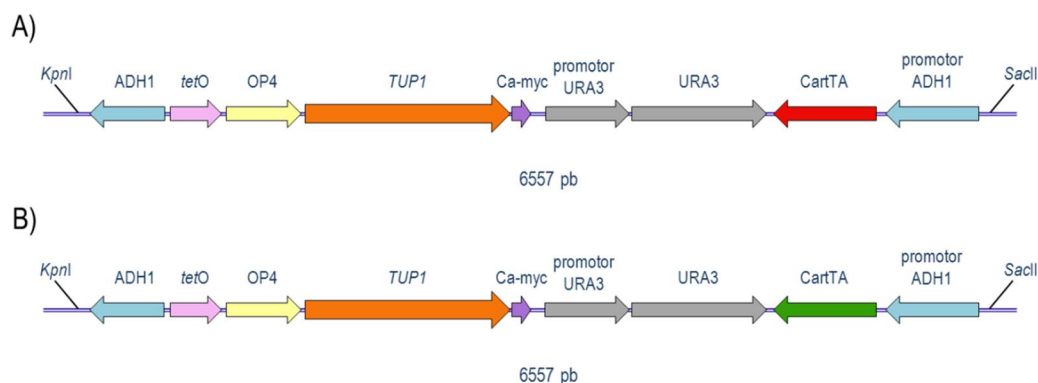
La región de integración del pNIM1R-URA3-TUP1 porta el gen *TUP1* fusionado al epítipo myc para posibilitar su detección y bajo el control del promotor TET en su versión reprimible por tetraciclina. El promotor y la región final de *ADH1* permiten la integración en el genoma de *C. albicans* y el marcador de auxotrofia URA3 la selección de los transformantes positivos (Figura 53).

Mediante digestión con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Sac* II se obtuvo la región de integración, dirigida al locus *ADH1* del mutante *tup1Δ* (*ura*<sup>-</sup>) de *C. albicans*.

### a.2. Contrucción de TUP1<sup>IND</sup>

En esta ocasión el plásmido de origen fue el pNIM1R-URA3-TUP1 anteriormente construido. Fue digerido con la enzima de restricción *Pst* I, liberando una pequeña secuencia de 1,5 Kb que contiene el transactivador reprimible. El vector resultante fue ligado con un inserto que contenía el transactivador inducible, obtenido del plásmido pNIM1-RFP (Prieto, 2014) por digestión con la misma enzima de restricción.

La secuencia de interés de la construcción pNIM1-URA3-TUP1 (Figura 53) fue digerida con las enzimas *Kpn* I y *Sac* II e integrada en el locus *ADH1* del mutante *tup1Δ* (*ura*<sup>-</sup>) de *C. albicans*.



**Figura 53. Regiones de integración para la obtención de las cepas TUP1<sup>REP</sup> y TUP1<sup>IND</sup>**

Esquema de los componentes de las secuencias de integración de los plásmidos pNIM1R-URA3-TUP1 (A) y pNIM1-URA3-TUP1 (B). Las enzimas Kpn I y Sac II flanquean las secuencias del gen *ADH1* que producirá la recombinación homóloga en el genoma de *C. albicans*. En ambos casos *TUP1* está fusionado al epítopo myc y el marcador auxotrófico es URA3. El transactivador se encuentra en su versión reprimible (A, rojo) e inducible (B, verde).

## 5. Manipulación de Proteínas y Técnicas Inmunológicas

### A. Sistema monodimensional

#### a) Obtención de extractos proteicos y preparación de las muestras

Las muestras de interés para la detección de proteínas mediante anticuerpos se recogieron, a menos que se indique lo contrario, en fase estacionaria del crecimiento. Las células fueron homogeneizadas en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH=8, glicerol 10 %, TritonX-100 1 %, SDS 0,1 %, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, ortovanadato de sodio 1 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 50 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, EDTA 5 mM pH=8, PMSF e inhibidores de proteasas) y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. La obtención de los extractos proteicos se realizó mediante rotura celular por perlas de vidrio (Martin *et al.*, 2000), siendo los pulsos de ruptura de 4 repeticiones con una duración de 30 segundos cada una y en una Fast-Prep.

Tras su obtención, los extractos proteicos fueron valorados midiendo la absorbancia a 280 nm (1 unidad de densidad óptica a 280 nm equivale a 1 mg/mL de proteína) en un espectrofotómetro Beckman DU 640. A partir de esta medida, los extractos fueron igualados a la misma concentración en tampón de carga (Tris-HCl 0,1 M pH=6,8, glicerol 20 %, SDS 4 %, DTT 0,1 M y azul de bromofenol), hervidos a 99 °C durante 10 minutos y

centrifugados a 13000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar restos celulares. Finalmente, se llevó a cabo la electroforesis.

### b) Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % en cubetas Miniprotean (Bio-Rad), usando un tampón Tris-glicina-SDS y a un voltaje de 150 V. Se utilizaron patrones de peso molecular suministrados por Bio-Rad.

Posteriormente, las proteínas ya separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) en cubetas Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) usando un tampón Tris-glicina-SDS-metanol, a un voltaje de 100 V durante 1 hora.

Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada al 5 % en PBS-Tween-20 (TPBS) al 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4 °C.

### c) Inmunodetección

La incubación de la membrana con el anticuerpo primario se realizó diluyendo éste en leche desnatada al 1 % en TPBS durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Tras tres lavados de 10 minutos cada uno en TPBS, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, diluido del mismo modo que el anterior y durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez hecha ésta segunda incubación, se hicieron 3 lavados de 15 minutos cada uno en TPBS y un último lavado con agua desionizada.

El revelado se llevó a cabo con el sistema fluorescente *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences). Este sistema presenta la gran ventaja de permitir la incubación de varios anticuerpos (con diferentes fluorocromos) al mismo tiempo, pudiéndolos detectar en distintos canales.

Los anticuerpos empleados se resumen en la Tabla 8.

ANTICUERPO	CARACTERÍSTICAS	CASA COMERCIAL
Anti-myc clon 4A6	Monoclonal de ratón	Millipore
Anti-HA High Affinity	Monoclonal de rata	Roche
IRDye 800CW Goat anti-mouse	Anticuerpo secundario de ratón (verde)	LI-COR Biosciences
IRDye 680CW Goat anti-mouse	Anticuerpo secundario de ratón (rojo)	LI-COR Biosciences
IRDye 800RD Goat anti-rat	Anticuerpo secundario de rata (verde)	LI-COR Biosciences

**Tabla 8. Anticuerpos utilizados en este trabajo**

## B. Sistema bidimensional

### a) Obtención de extractos proteicos y preparación de las muestras

El extracto proteico analizado por 2DE fue obtenido a partir de un cultivo en fase exponencial del crecimiento de la cepa CAF2-OVA a DO = 1, y fue el mismo para el análisis de todos los sueros del correspondiente experimento.

Las células se resuspendieron en tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH=7,5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM e inhibidores de proteasas) en el cual se llevó a cabo la rotura celular por perlas de vidrio en una Fast-Prep, siendo los pulsos de ruptura de 5 repeticiones de 30 segundos cada una. A continuación el extracto fue precipitado con TCA al 15 % durante 1 hora y lavado con acetona durante 16 horas. Finalmente, fue centrifugado y resuspendido en tampón de proteínas (Tris-HCl 30 mM pH 8,5, urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS al 4 % p/v).

La medición del extracto se realizó mediante el método Bradford.

### b) Isoelectroenfoque, electroforesis de proteínas y transferencia a membrana

Para llevar a cabo la separación de proteínas se emplearon 150 µg de la muestra proteica.

En el isoelectroenfoque, las proteínas se separaron en función de su pI usando tiras de enfoque isoelectroico o inmobilinas (GE Healthcare) de 18 cm y de pH 3-11. Para ello, al volumen de extracto proteico correspondiente a 150 µg se le añadió tampón de rehidratación (Urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4 % p/v, DTE 65 mM, anfolitos pH 3-11 al 2 % y trazas de azul de bromofenol) hasta llegar a un volumen final de muestra de 350 µL. Las tiras se depositaron en sarcófagos individuales, fueron cubiertas con la muestra proteica y selladas con vaselina (Plus One). La separación de proteínas se realizó en un equipo IPGphor (Amersham) mediante la repetición de distintos ciclos y durante 18 horas aproximadamente.

Una vez realizado el isoelectroenfoque, cada tira fue incubada durante 12 minutos en un primer tampón de equilibrado (Tris-HCl 0,5 M pH 6,5, urea 6 M, glicerol al 30 %, SDS al 2 % y DTE al 20 %) y en un segundo tampón de equilibrado (Tris-HCl 0,5 M pH 6,5, urea 6 M, glicerol al 30 %, SDS al 2 %, iodoacetamida al 25 % y trazas de azul de bromofenol) durante 5 minutos. Tras ambas incubaciones, cada tira fue colocada en la parte superior del correspondiente gel.

Los geles de poliacrilamida fueron hechos 24 horas previas a la electroforesis, y su polimerización se produjo durante toda la noche a 4 °C. Cada gel contenía Tris-HCl 2,5 M pH 8,9, acrilamida al 30 %, PDA al 2 %, SDS al 10 %, PSA al 20 %, tiosulfato sódico, TEMED y agua miliQ hasta un volumen final de 100 mL.

La electroforesis se llevó a cabo sobre cuatro geles por vez, de los cuales tres eran usados para transferir las proteínas a una membrana y el gel restante era teñido con azul de Coomassie.

Para la tinción con Coomassie coloidal, en primer lugar se incubó el gel en una solución de metanol al 50 % y ácido fosfórico al 2 % para fijar las proteínas durante 3 horas o toda la noche. Tras la fijación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en agua miliQ. Posteriormente, el gel fue incubado durante 1 hora en una solución de metanol al 33 %, sulfato amónico al 17 %, ácido fosfórico al 3 % y agua miliQ, y finalmente fue teñido en la misma solución anterior con azul de Coomassie al 17 % durante toda la noche. Los restos de colorante se eliminaron con varios lavados en agua miliQ.

La transferencia de los tres geles se realizó sobre membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham), aplicando un voltaje constante de 30 V durante 16 horas a 4 °C.

### c) Inmunodetección

Para comprobar que la transferencia se había llevado a cabo correctamente, las membranas fueron teñidas en una solución de ácido acético al 10 % y rojo ponceau al 1 %, y posteriormente desteñidas con varios lavados en agua miliQ. El bloqueo se llevó a cabo en leche desnatada al 5 % en TPBS durante 1 hora.

Como anticuerpos primarios se usaron los sueros policlonales de distintos grupos de ratones, y a su vez de distintos tiempos dentro de cada grupo. Cada suero empleado era una mezcla en proporciones iguales de todos los individuos, y se incubó con la membrana a una concentración de 1:500 en leche desnatada al 1 % en TPBS durante 2 horas. Debido a la imposibilidad de deshibridar las membranas para su reutilización, se incubó cada suero con su propia membrana.

Como secundario, en todos los casos se empleó el anticuerpo IRDye 680CW goat anti-mouse (1/4000), y cada membrana fue revelada por el sistema Odyssey. Los parámetros de intensidad del revelado fueron idénticos para todos los casos, así como su retoque digital posterior.

## C. Titulación de anticuerpos por ELISA

Para el estudio de la respuesta humoral frente a *C. albicans* se obtuvieron distintos sueros como se detalla en la Figura 42. Tras su extracción, el plasma fue separado de la fracción celular mediante incubación a 37 °C durante 1 hora y posterior centrifugación a 13000 r.p.m. Todos los sueros fueron titulados por ELISA para cuantificar su contenido de anticuerpos anti-*Candida*. El procedimiento se realizó en placas de 96 pocillos y del siguiente modo:

En primer lugar se realizó el tapizado de cada pocillo con el extracto proteico total de la cepa CAF2-OVA. En cada uno se depositó una cantidad de extracto de 500 ng diluida en tampón de tapizado, para que cubriese la base del pocillo durante toda la noche a 4 °C. Una vez retirado dicho tampón, se realizó un lavado con TPBS y a continuación se bloqueó con leche al 5 % en TPBS durante 1,5 horas.

Cada anticuerpo primario se depositó en una fila de la placa multipocillo, comenzando con una dilución 1:20 en leche al 1 % en TPBS y realizando diluciones seriadas 1:2 hasta el último pocillo. Se incubó durante 2 horas.

Una vez realizados 3 lavados con TPBS, se añadió como anticuerpo secundario el anti-mouse acoplado a HRP, a una concentración de 1:2000 en leche al 1 % en TPBS. Se incubó durante 1 hora.

Tras realizar otros 3 lavados, se realizó una solución de revelado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M y ácido cítrico 0,1 M y agua miliQ hasta 75 mL) a la cual se le añadió una tableta de OPD y 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el momento de su utilización. El tampón de revelado se dejó actuar 5 minutos en oscuridad y las reacciones fueron paradas con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 M.

Finalmente, se midió la densidad óptica de cada pocillo a 492 nm.

## 6. Ensayos en animales

### A. Ensayos de colonización

#### a) Protocolo

Todos los experimentos de colonización gastrointestinal de *C. albicans* en ratón fueron realizados del siguiente modo:

Desde la llegada al animalario de los ratones hasta el comienzo del experimento en cuestión pasaron entre 4 y 6 días para permitir su aclimatación. Cada grupo de animales se mantiene en una jaula con comida ilimitada y el agua estéril de bebida contiene un tratamiento antibiótico (estreptomicina 2 mg/mL, bacitracina 1 mg/mL y gentamicina 0,1 mg/mL) que hace posible la colonización por *C. albicans* y que comienza 3 días previos a la inoculación. Todos los antibióticos fueron suministrados por Sigma.

La colonización comienza con la inoculación de  $10^7$  células de la cepa de interés, en un volumen de PBS de 100  $\mu\text{L}$  y mediante una cánula intragástrica acoplada a una jeringa. Las células provienen de un cultivo en fase estacionaria y se lavan 3 veces con PBS antes de realizar la suspensión empleada.

Cada 2-4 días y durante todo el experimento se toman de cada individuo muestras de heces frescas, cuyo peso es medido para ajustar con PBS estéril a una concentración estándar de 40 mg/mL. Las heces son disgregadas de manera mecánica para proceder finalmente a la siembra de varias diluciones de esta suspensión en placas de medio SD con cloranfenicol a 20 mg/mL. El recuento de CFUs nos permite calcular la tasa de colonización por *C. albicans* en cada momento, que finalmente se expresa como logaritmo de CFUs por gramo de heces.

### b) Análisis del contenido intestinal

El análisis de la presencia de *C. albicans* en el contenido intestinal se realizó obteniendo el intestino completo en condiciones asépticas. Se dividió en cuatro partes (porciones inicial y final del intestino delgado, ciego y colon) y el contenido de cada uno fue homogeneizado en PBS estéril a una concentración de 40 mg/mL y posteriormente sembrado en placas de SD con cloranfenicol para proceder al recuento de CFUs.

### c) Cuantificación de aCT en intestino

La concentración a la que se encuentra la aCT en cada porción de intestino fue hallada empleando las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} \mu\text{g aCT} / \text{mL} &= \frac{\text{Concentración mínima de filamentación } (\mu\text{g/mL})}{\text{Dilución inicial (20)}} \times \text{Dilución inicial (20)} \\ \mu\text{g aCT} / \text{g intestino} &= \frac{\mu\text{g aCT} / \text{mL} \times \text{Vol. PBS (mL)}}{\text{Peso (g)}} \end{aligned}$$

La concentración mínima de filamentación se refiere a 0,08  $\mu\text{g/mL}$ , la mínima de aCT para que la cepa filamente por completo y a la que suponemos que se encuentra la muestra de intestino en el cultivo cuando genera dicho fenotipo. Las muestras de intestino se añadieron al cultivo inicial a una concentración de 1/20 en medio líquido YPD y por diluciones seriadas (1/5) se obtuvieron concentraciones decrecientes. Cada uno de estos cultivos fue inoculado con la cepa TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup> a una densidad óptica de 0,01 e incubados a 37 °C durante 16 horas antes de observar el fenotipo generado.

Teniendo en cuenta la dilución a la que la hemos añadido la muestra de intestino al medio de cultivo (1/20), se calculó la concentración de aCT en la muestra empleada, obtenida del homogeneizado de intestino. El volumen de PBS en que fueron suspendidas las porciones

de intestino (en función de su peso) y el peso en gramos de las mismas nos permiten calcular la concentración de aCT por gramo de intestino.

#### d) Histología

Para la visualización de cortes histológicos intestinales, el colon fue extraído e inmediatamente fijado en formaldehído al 10 % (Bio-optica, Milán) durante 24 horas. A continuación, el órgano fue deshidratado y embebido en parafina para realizar cortes de entre 3 y 4  $\mu\text{m}$ , los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina.

## B. Ensayos de infección sistémica

#### a) Protocolo

Los ensayos de infección sistémica se realizaron del siguiente modo:

Al igual que para los ensayos de colonización, el periodo de aclimatación previo al experimento era de entre 4 y 6 días. Las condiciones de agua y alimento fueron ilimitadas durante todo el proceso. Momentos antes de realizar la infección, todos los individuos del grupo fueron marcados y su peso fue anotado. Para proceder a la infección se emplearon unos cepos (BIOSEB) para inmovilizar al animal y la inyección de la dosis correspondiente en cada caso se realizó en la vena lateral de la cola. La evolución en el peso de todos los ratones se controló diariamente, así como la mortalidad.

#### b) Análisis de órganos diana

Con el objetivo de cuantificar el alojamiento de *C. albicans* en órganos diana durante la infección sistémica, como son los riñones, el hígado, el cerebro o el bazo, se procedió a la extracción de éstos en condiciones asépticas. Cada órgano fue pesado y triturado en 1 mL de PBS estéril usando un homogeneizador rotatorio.

La cuantificación se realizó a través de la siembra de varias diluciones de cada órgano en medio SD, y el alojamiento fue definido en función del peso correspondiente.



## 7. Técnicas de microscopía y citometría de flujo

### A. Microscopía óptica

Las imágenes de muestras biológicas en fresco o de células fijadas se obtuvieron por contraste de fases en un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U, utilizando el software HCLImage. El brillo y contraste de las imágenes fue uniformizado con éste mismo programa.

Los cortes histológicos obtenidos en la Universidad de Perugia (Italia) fueron visualizados en un microscopio BX51, y las imágenes se tomaron a través de una cámara de alta resolución DP71, ambos de Olympus.

### B. Microscopía de fluorescencia

Para la visualización de fluorescencia verde o roja se empleó un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U, y las imágenes fueron tomadas con una cámara Hamamatsu ORCA-ER-CCD a través del software HCLImage. Los filtros utilizados fueron Nikon B-2E/C para el verde (GFP) y Nikon G-2A para el rojo (RFP). Los parámetros para la toma de imágenes fueron idénticos para todas ellas.

## 8. Soporte bioinformático

Para la representación y análisis estadístico de todos los datos se ha empleado el programa **GraphPad Prism**. Las medias de los valores, salvo que se indique lo contrario, se representan  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

Durante la realización de este trabajo se han consultado las siguientes bases de datos:

**PubMed.** Base de datos de revistas científicas de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

**Candida Genome Database.** Base de datos para el análisis del genoma de *C. albicans*. Ofrece información sobre secuencias de DNA, proteínas, homólogos en *S. cerevisiae*, etc. <http://www.candidagenome.org/>

**Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).** Permite buscar homologías y establecer comparaciones entre todas las secuencias disponibles en la base de datos, tanto de DNA como de proteínas. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

**Compluyeast 2D-PAGE Database.** Base de datos que recoge los mapas de referencia del proteoma expresado por *C. albicans* en determinadas condiciones y obtenidos mediante separación biodimensional en gel. <http://compluyeast2dpage.dacya.ucm.es/>



# Listado de Figuras y Tablas

---



<b>Figura 1.</b> Estructura de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....	37
<b>Figura 2.</b> Rutas de señalización mediadas por MAPKs.....	40
<b>Figura 3.</b> Rutas implicadas en la regulación de la filamentación en <i>C. albicans</i> .....	42
<b>Figura 4.</b> Morfologías celulares de <i>C. albicans</i> .....	44
<b>Figura 5.</b> Fenotipo de la cepa mutante <i>tup1Δ</i> .....	48
<b>Figura 6.</b> Control de la filamentación por Tup1 .....	49
<b>Figura 7.</b> Regulación de la expresión de <i>TUP1</i> con el sistema TET-ON/OFF en las cepas <i>TUP1<sup>REP</sup></i> y <i>TUP1<sup>IND</sup></i> .....	76
<b>Figura 8.</b> Morfología de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup></i> en presencia de doxiciclina .....	77
<b>Figura 9.</b> Morfología de la cepa <i>TUP1<sup>IND</sup></i> en presencia de doxiciclina .....	78
<b>Figura 10.</b> Regulación de la expresión de <i>TUP1</i> y de la morfología celular en las cepas <i>TUP1<sup>REP</sup></i> y <i>TUP1<sup>IND</sup></i> .....	79
<b>Figura 11.</b> Detección de la expresión de RFP-myc en las cepas <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP</i> y <i>TUP1<sup>IND</sup>-RFP</i> .....	80
<b>Figura 12.</b> Marcaje con RFP <sup>REP</sup> de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> .....	81
<b>Figura 13.</b> Represión e inducción de <i>TUP1</i> en presencia de aCT .....	82
<b>Figura 14.</b> Morfología de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> en presencia de doxiciclina y aCT...83	
<b>Figura 15.</b> Efectos de la aCT y la doxiciclina en la represión del promotor TET.....	84
<b>Figura 16.</b> Morfología colonial de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> .....	85
<b>Figura 17.</b> Cuantificación de la filamentación de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> en medio líquido .....	86
<b>Figura 18.</b> Crecimiento de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> en medio YPD.....	87
<b>Figura 19.</b> Crecimiento en condiciones limitantes de oxígeno .....	88
<b>Figura 20.</b> Sensibilidad de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> a sales biliares y SDS .....	89
<b>Figura 21.</b> Sensibilidad a estrés osmótico de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> .....	90
<b>Figura 22.</b> Sensibilidad de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> a compuestos que alteran la composición de la pared celular .....	91
<b>Figura 23.</b> Sensibilidad de la cepa <i>TUP1<sup>REP</sup>-RFP<sup>REP</sup></i> a antifúngicos que alteran la membrana celular .....	92

<b>Figura 24.</b> Cinética de inducción de la filamentación en la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> en presencia de suero .....	93
<b>Figura 25.</b> Influencia de la filamentación en la adhesión a poliestireno de la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> .....	95
<b>Figura 26.</b> Adhesión <i>ex vivo</i> a intestino de la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> .....	96
<b>Figura 27.</b> Fagocitosis y muerte de la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> en presencia de macrófagos murinos RAW 264.7 .....	99
<b>Figura 28.</b> Fagocitosis y muerte de la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> en interacción con células PMNs.....	100
<b>Figura 29.</b> Patrón de expresión de citoquinas en células PMNs en interacción con <i>C. albicans</i> .....	101
<b>Figura 30.</b> Tratamiento con aCT durante la colonización por <i>C. albicans</i> .....	103
<b>Figura 31.</b> Presencia de aCT en el intestino de ratones tratados .....	104
<b>Figura 32.</b> Concentración de aCT en el intestino de ratones tratados con el antibiótico..	105
<b>Figura 33.</b> Colonización de la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> .....	106
<b>Figura 34.</b> Efecto de la inducción de la filamentación en la colonización gastrointestinal .....	107
<b>Figura 35.</b> Colonización de la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> en presencia de aCT .....	109
<b>Figura 36.</b> Histología de colon en ratones colonizados .....	111
<b>Figura 37.</b> Expresión de citoquinas durante la colonización por <i>C. albicans</i> .....	112
<b>Figura 38.</b> Presencia de aCT en órganos diana tras un tratamiento oral .....	113
<b>Figura 39.</b> Virulencia de la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> .....	115
<b>Figura 40.</b> Alojamiento en órganos de ratones infectados con la cepa TUP1 <sup>REP</sup> -RFP <sup>REP</sup> .....	116
<b>Figura 41.</b> Producción de ovalbúmina en la cepa CAF2-OVA .....	118
<b>Figura 42.</b> Esquema detallado de los modelos desarrollados .....	119
<b>Figura 43.</b> Parámetros analizados en los ensayos de colonización (C), infección (I) y colonización seguida de infección (C + I) .....	121
<b>Figura 44.</b> Titulación de sueros por ELISA .....	123
<b>Figura 45.</b> Mapa 2DE de proteínas citoplasmáticas de <i>C. albicans</i> .....	124

<b>Figura 46.</b> Detección de proteínas inmunogénicas en ratones sin tratar .....	125
<b>Figura 47.</b> Detección temprana de proteínas inmunogénicas durante la colonización por <i>C. albicans</i> .....	126
<b>Figura 48.</b> Detección de proteínas inmunogénicas durante la infección por <i>C. albicans</i> .....	127
<b>Figura 49.</b> Detección de proteínas inmunogénicas durante una colonización seguida de una infección sistémica .....	128
<b>Figura 50.</b> Comparativa de patrones de anticuerpos obtenidos en los tres modelos .....	130
<b>Figura 51.</b> Esquema de los ensayos realizados para el estudio de la capacidad de protección de cada modelo .....	133
<b>Figura 52.</b> Resistencia de ratones pre tratados con <i>C. albicans</i> a una infección letal ....	134
<b>Figura 53.</b> Regiones de integración para la obtención de las cepas TUP1 <sup>REP</sup> y TUP1 <sup>IND</sup> .....	175



<b>Tabla 1.</b> Patrones de proteínas inmunogénicas en los tres modelos desarrollados .....	132
<b>Tabla 2.</b> Cepas de microorganismos empleadas .....	165
<b>Tabla 3.</b> Líneas celulares empleadas .....	166
<b>Tabla 4.</b> Medios de cultivo empleados para el crecimiento de microorganismos .....	167
<b>Tabla 5.</b> Compuestos adicionales empleados para ensayos específicos .....	168
<b>Tabla 6.</b> Plásmidos empleados y generados en este trabajo .....	173
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos empleados .....	173
<b>Tabla 8.</b> Anticuerpos utilizados en este trabajo .....	176

## Bibliografía

---



- Akins, R. A. (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol*, 43(4), 285-318.
- Alem, M. A., Oteef, M. D., Flowers, T. H., & Douglas, L. J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell*, 5(10), 1770-1779. doi: 10.1128/EC.00219-06
- Almeida, R. S., Wilson, D., & Hube, B. (2009). *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res*, 9(7), 1000-1012. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00570.x
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., . . . Nombela, C. (1999). Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3058-3068.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Roman, E., Negredo, A. I., Eisman, B., Nombela, C., & Pla, J. (2003). The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 2(2), 351-361.
- Alonso-Monge, R., Roman, E., Arana, D. M., Prieto, D., Urrialde, V., Nombela, C., & Pla, J. (2010). The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*, 47(7), 587-601. doi: 10.1016/j.fgb.2010.03.009
- Alloush, H. M., Lopez-Ribot, J. L., & Chaffin, W. L. (1996). Dynamic expression of cell wall proteins of *Candida albicans* revealed by probes from cDNA clones. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 34(2), 91-97.
- Amin, A. R., Attur, M. G., Thakker, G. D., Patel, P. D., Vyas, P. R., Patel, R. N., . . . Abramson, S. B. (1996). A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24), 14014-14019.
- Anderson, J. M., & Soll, D. R. (1987). Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5579-5588.
- Andes, D., Marchillo, K., Stamstad, T., & Conklin, R. (2003). *In vivo* pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(4), 1193-1199.
- Angiolella, L., Facchin, M., Stringaro, A., Maras, B., Simonetti, N., & Cassone, A. (1996). Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J Infect Dis*, 173(3), 684-690.
- Aoki, W., Ueda, T., Tatsukami, Y., Kitahara, N., Morisaka, H., Kuroda, K., & Ueda, M. (2013). Time-course proteomic profile of *Candida albicans* during adaptation to a fetal serum. *Pathog Dis*, 67(1), 67-75. doi: 10.1111/2049-632X.12003
- Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., & Pla, J. (2005). The Pbs2 MAP kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology*, 151(Pt 4), 1033-1049. doi: 10.1099/mic.0.27723-0
- Arvanitis, M., Glavis-Bloom, J., & Mylonakis, E. (2013). Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*, 1832(9), 1378-1383. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.03.008
- Askew, C., Sellam, A., Epp, E., Hogues, H., Mullick, A., Nantel, A., & Whiteway, M. (2009). Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000612. doi: 10.1371/journal.ppat.1000612

- Audry, C. (1887). Sur l'evolution du champignon du muguet. *Revue de Médecine (Paris)*, 7, 586-595.
- Bachewich, C., Thomas, D. Y., & Whiteway, M. (2003). Depletion of a polo-like kinase in *Candida albicans* activates cyclase-dependent hyphal-like growth. *Mol Biol Cell*, 14(5), 2163-2180. doi: 10.1091/mbc.02-05-0076
- Baginski, M., Resat, H., & Borowski, E. (2002). Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochim Biophys Acta*, 1567(1-2), 63-78.
- Baillie, G. S., & Douglas, L. J. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 48(7), 671-679. doi: 10.1099/00222615-48-7-671
- Balish, E., Filutowicz, H., & Oberley, T. D. (1990). Correlates of cell-mediated immunity in *Candida albicans*-colonized gnotobiotic mice. *Infect Immun*, 58(1), 107-113.
- Barelle, C. J., Manson, C. L., MacCallum, D. M., Odds, F. C., Gow, N. A., & Brown, A. J. (2004). GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans*. *Yeast*, 21(4), 333-340. doi: 10.1002/yea.1099
- Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A., Odds, F. C., & Brown, A. J. (2006). Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol*, 8(6), 961-971. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00676.x
- Barnett, J. A. (2008). A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast*, 25(6), 385-417. doi: 10.1002/yea.1595
- Bassilana, M., Hopkins, J., & Arkowitz, R. A. (2005). Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryot Cell*, 4(3), 588-603. doi: 10.1128/EC.4.3.588-603.2005
- Bastidas, R. J., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2009). The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5(2), e1000294. doi: 10.1371/journal.ppat.1000294
- Belenky, P., Camacho, D., & Collins, J. J. (2013). Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. *Cell Rep*, 3(2), 350-358. doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.021
- Bendel, C. M., & Hostetter, M. K. (1993). Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Identification of the participating ligands and development of inhibitory peptides. *Journal of Clinical Investigation*, 92(4), 1840-1849. doi: 10.1172/JCI116775
- Benko, S., Magyarics, Z., Szabo, A., & Rajnavolgyi, E. (2008). Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors. *Biological Chemistry*, 389(5), 469-485.
- Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 9(6), 595-601. doi: 10.1016/j.mib.2006.10.007
- Bertram, G., Swoboda, R. K., Gooday, G. W., Gow, N. A., & Brown, A. J. (1996). Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast*, 12(2), 115-127. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199602)12:2<115::AID-YEA889>3.0.CO;2-E
- Birse, C. E., Irwin, M. Y., Fonzi, W. A., & Sypherd, P. S. (1993). Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun*, 61(9), 3648-3655.
- Biswas, S., Van Dijck, P., & Datta, A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(2), 348-376. doi: 10.1128/MMBR.00009-06

- Bockmuhl, D. P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A., & Ernst, J. F. (2001). Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 42(5), 1243-1257.
- Braun, B. R. (1997). Control of Filament Formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor *TUP1*. *Science*, 277(5322), 105-109. doi: 10.1126/science.277.5322.105
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X., & Johnson, A. D. (2000). Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*, 156(1), 31-44.
- Braun, B. R., & Johnson, A. D. (2000). *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, 155(1), 57-67.
- Braun, B. R., Kadosh, D., & Johnson, A. D. (2001). *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO Journal*, 20(17), 4753-4761. doi: 10.1093/emboj/20.17.4753
- Brena, S., Omaetxebarria, M. J., Elguezabal, N., Cabezas, J., Moragues, M. D., & Ponton, J. (2007). Fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3. *Infection and Immunity*, 75(7), 3680-3682. doi: 10.1128/IAI.01840-06
- Brock, M. (2009). Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol*, 12(4), 371-376. doi: 10.1016/j.mib.2009.05.004
- Bromuro, C., La Valle, R., Sandini, S., Urbani, F., Ausiello, C. M., Morelli, L., . . . Cassone, A. (1998). A 70-kilodalton recombinant heat shock protein of *Candida albicans* is highly immunogenic and enhances systemic murine candidiasis. *Infect Immun*, 66(5), 2154-2162.
- Brown, A. J., & Gow, N. A. (1999). Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol*, 7(8), 333-338.
- Brown, D. H., Jr., Giusani, A. D., Chen, X., & Kumamoto, C. A. (1999). Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Molecular Microbiology*, 34(4), 651-662.
- Brown, D. H., Jr., Slobodkin, I. V., & Kumamoto, C. A. (1996). Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. *Molecular and General Genetics*, 251(1), 75-80.
- Brown, G. D., & Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 413(6851), 36-37. doi: 10.1038/35092620
- Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S., & Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 197(9), 1119-1124. doi: 10.1084/jem.20021890
- Brown, G. D., Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, J. A., Williams, D. L., Martinez-Pomares, L., . . . Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med*, 196(3), 407-412.
- Bugli, F., Cacaci, M., Martini, C., Torelli, R., Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Paroni Sterbini, F. (2013). Human monoclonal antibody-based therapy in the treatment of invasive candidiasis. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013, 403121. doi: 10.1155/2013/403121
- Bundle, D. R., Nycholat, C., Costello, C., Rennie, R., & Lipinski, T. (2012). Design of a *Candida albicans* disaccharide conjugate vaccine by reverse engineering a protective monoclonal antibody. *ACS Chemical Biology*, 7(10), 1754-1763. doi: 10.1021/cb300345e

- Cabezas, J., Albaina, O., Montanez, D., Sevilla, M. J., Moragues, M. D., & Ponton, J. (2010). Potential of anti-*Candida* antibodies in immunoprophylaxis. *Immunotherapy*, 2(2), 171-183. doi: 10.2217/imt.09.76
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries I, J., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G. J., . . . Figdor, C. G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 33(2), 532-538. doi: 10.1002/immu.200310029
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12), 7877-7882. doi: 10.1073/pnas.082243699
- Cannon, R. D., Jenkinson, H. F., & Shepherd, M. G. (1992). Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, 235(2-3), 453-457.
- Cao, F., Lane, S., Raniga, P. P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K., . . . Liu, H. (2006). The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 17(1), 295-307. doi: 10.1091/mbc.E05-06-0502
- Care, R. S., Trevethick, J., Binley, K. M., & Sudbery, P. E. (1999). The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Molecular Microbiology*, 34(4), 792-798.
- Casadevall, A. (1995). Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun*, 63(11), 4211-4218.
- Casadevall, A., Cassone, A., Bistoni, F., Cutler, J. E., Magliani, W., Murphy, J. W., . . . Romani, L. (1998). Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? *Med Mycol*, 36 Suppl 1, 95-105.
- Casadevall, A., Feldmesser, M., & Pirofski, L. A. (2002). Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 5(4), 386-391.
- Caselli, M., Holton, J., Boldrini, P., Vaira, D., & Calo, G. (2010). Morphology of segmented filamentous bacteria and their patterns of contact with the follicle-associated epithelium of the mouse terminal ileum: implications for the relationship with the immune system. *Gut Microbes*, 1(6), 367-372. doi: 10.4161/gmic.1.6.14390
- Cassone, A., De Bernardis, F., & Torososantucci, A. (2005). An outline of the role of anti-*Candida* antibodies within the context of passive immunization and protection from candidiasis. *Current Molecular Medicine*, 5(4), 377-382.
- Castillo, L., Calvo, E., Martinez, A. I., Ruiz-Herrera, J., Valentin, E., Lopez, J. A., & Sentandreu, R. (2008). A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics*, 8(18), 3871-3881. doi: 10.1002/pmic.200800110
- Castillo, L., Martinez, A. I., Garcera, A., Garcia-Martinez, J., Ruiz-Herrera, J., Valentin, E., & Sentandreu, R. (2006). Genomic response programs of *Candida albicans* following protoplasting and regeneration. *Fungal Genet Biol*, 43(2), 124-134. doi: 10.1016/j.fgb.2005.12.002
- Caza, M., & Kronstad, J. W. (2013). Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 80. doi: 10.3389/fcimb.2013.00080
- Cenci, E., Mencacci, A., Spaccapelo, R., Tonnetti, L., Mosci, P., Enssle, K. H., . . . Bistoni, F. (1995). T helper cell type 1 (Th1)- and Th2-like responses are present in mice with gastric candidiasis but protective immunity is associated with Th1 development. *J Infect Dis*, 171(5), 1279-1288.



- Clemons, K. V., Spearow, J. L., Parmar, R., Espiritu, M., & Stevens, D. A. (2004). Genetic susceptibility of mice to *Candida albicans* vaginitis correlates with host estrogen sensitivity. *Infect Immun*, 72(8), 4878-4880. doi: 10.1128/IAI.72.8.4878-4880.2004
- Cole, G. T., Seshan, K. R., Phaneuf, M., & Lynn, K. T. (1991). Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(8), 637-646.
- Cole, M. F., Bowen, W. H., Zhao, X. J., & Cihlar, R. L. (1995). Avirulence of *Candida albicans* auxotrophic mutants in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett*, 126(2), 177-180.
- Conti, H. R., & Gaffen, S. L. (2010). Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect*, 12(7), 518-527. doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.013
- Conti, H. R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J. N., Lindemann, M. J., . . . Gaffen, S. L. (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*, 206(2), 299-311. doi: 10.1084/jem.20081463
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., & Brown, A. J. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, 143 ( Pt 2), 303-311.
- Cota, E., & Hoyer, L. L. (2015). The *Candida albicans* agglutinin-like sequence family of adhesins: functional insights gained from structural analysis. *Future Microbiology*, 10(10), 1635-1548. doi: 10.2217/fmb.15.79
- Court, H., & Sudbery, P. (2007). Regulation of Cdc42 GTPase activity in the formation of hyphae in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 18(1), 265-281. doi: 10.1091/mbc.E06-05-0411
- Cowan, K. J., & Storey, K. B. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 7), 1107-1115.
- Csank, C., Makris, C., Meloche, S., Schroppel, K., Rollinghoff, M., Dignard, D., . . . Whiteway, M. (1997). Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 8(12), 2539-2551.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Marcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., . . . Whiteway, M. (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*, 66(6), 2713-2721.
- Cua, D. J., & Tato, C. M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews: Immunology*, 10(7), 479-489. doi: 10.1038/nri2800
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., & Tsien, R. Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 448-455.
- Curtis, M. M., & Way, S. S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 126(2), 177-185. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x
- Cutler, J. E., Corti, M., Lambert, P., Ferris, M., & Xin, H. (2011). Horizontal transmission of *Candida albicans* and evidence of a vaccine response in mice colonized with the fungus. *PLoS One*, 6(7), e22030. doi: 10.1371/journal.pone.0022030
- Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(3), 495-544. doi: 10.1128/MMBR.00032-07



- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), 130-180.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Chamilos, G., Lionakis, M. S., Lewis, R. E., & Kontoyiannis, D. P. (2007). Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(1), 42-55. doi: 10.1016/s1473-3099(06)70686-7
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5385-5394.
- Chaturvedi, A. K., Lazzell, A. L., Saville, S. P., Wormley, F. L., Jr., Monteagudo, C., & Lopez-Ribot, J. L. (2011). Validation of the tetracycline regulatable gene expression system for the study of the pathogenesis of infectious disease. *PLoS One*, 6(5), e20449. doi: 10.1371/journal.pone.0020449
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., & Fink, G. R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(14), 5048-5052. doi: 10.1073/pnas.0401416101
- Cheng, S. C., Joosten, L. A., Kullberg, B. J., & Netea, M. G. (2012). Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun*, 80(4), 1304-1313. doi: 10.1128/IAI.06146-11
- Cheng, S. C., van de Veerdonk, F. L., Lenardon, M., Stoffels, M., Plantinga, T., Smeekens, S., . . . Netea, M. G. (2011). The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(2), 357-366. doi: 10.1189/jlb.1210702
- Dabrowa, N., & Howard, D. H. (1981). Proline uptake in *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 127(2), 391-397.
- Davis, C. P., & Savage, D. C. (1974). Habitat, succession, attachment, and morphology of segmented, filamentous microbes indigenous to the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun*, 10(4), 948-956.
- De Backer, M. D., Magee, P. T., & Pla, J. (2000). Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, 54, 463-498. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.463
- De Bernardis, F., Arancia, S., Sandini, S., Graziani, S., & Norelli, S. (2015). Studies of Immune Responses in *Candida* vaginitis. *Pathogens*, 4(4), 697-707. doi: 10.3390/pathogens4040697
- De Bernardis, F., Boccanera, M., Adriani, D., Spreghini, E., Santoni, G., & Cassone, A. (1997). Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun*, 65(8), 3399-3405.
- de Groot, P. W., de Boer, A. D., Cunningham, J., Dekker, H. L., de Jong, L., Hellingwerf, K. J., . . . Klis, F. M. (2004). Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell*, 3(4), 955-965. doi: 10.1128/EC.3.4.955-965.2004
- De Luca, A., Carvalho, A., Cunha, C., Iannitti, R. G., Pitzurra, L., Giovannini, G., . . . Romani, L. (2013). IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis. *PLoS Pathog*, 9(7), e1003486. doi: 10.1371/journal.ppat.1003486

- de Repentigny, L. (2004). Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*, 7(4), 324-329. doi: 10.1016/j.mib.2004.06.001
- Denning, T. L., Norris, B. A., Medina-Contreras, O., Manicassamy, S., Geem, D., Madan, R., . . . Pulendran, B. (2011). Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol*, 187(2), 733-747. doi: 10.4049/jimmunol.1002701
- Dennison, P. M., Ramsdale, M., Manson, C. L., & Brown, A. J. (2005). Gene disruption in *Candida albicans* using a synthetic, codon-optimised Cre-loxP system. *Fungal Genet Biol*, 42(9), 737-748. doi: 10.1016/j.fgb.2005.05.006
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R., & Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278(5338), 680-686.
- Diez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-Garcia, F., Pla, J., Nombela, C., & Sanchez-Perez, M. (1997). Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun*, 65(2), 833-837.
- Diez-Orejas, R., Molero, G., Rios-Serrano, I., Vazquez, A., Gil, C., Nombela, C., & Sanchez-Perez, M. (1999). Low virulence of a morphological *Candida albicans* mutant. *FEMS Microbiol Lett*, 176(2), 311-319.
- Dixon, D. M., McNeil, M. M., Cohen, M. L., Gellin, B. G., & La Montagne, J. R. (1996). Fungal infections: a growing threat. *Public Health Reports*, 111(3), 226-235.
- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D. P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C. L., . . . Ernst, J. F. (2004). APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 15(7), 3167-3180. doi: 10.1091/10.1091/mbc.E03-11-0782
- Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A., & Tanaka, K. (1992). Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *Journal of General Microbiology*, 138(10), 2243-2251.
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, 11(1), 30-36.
- Dujardin, L., Walbaum, S., & Biguet, J. (1980). [Effect of glucose and nitrogen concentrations on the morphology of *Candida albicans* and the formation of chlamydospores in synthetic culture media]. *Mycopathologia*, 71(2), 113-118.
- Dunston, C. R., Griffiths, H. R., Lambert, P. A., Staddon, S., & Vernallis, A. B. (2011). Proteomic analysis of the anti-inflammatory action of minocycline. *Proteomics*, 11(1), 42-51. doi: 10.1002/pmic.201000273
- Ebanks, R. O., Chisholm, K., McKinnon, S., Whiteway, M., & Pinto, D. M. (2006). Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins. *Proteomics*, 6(7), 2147-2156. doi: 10.1002/pmic.200500100
- Eckert, S. E., & Muhlschlegel, F. A. (2009). Promoter regulation in *Candida albicans* and related species. *FEMS Yeast Res*, 9(1), 2-15. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00455.x
- Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N., & Wenzel, R. P. (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 29(2), 239-244. doi: 10.1086/520192
- Eisman, B., Alonso-Monge, R., Roman, E., Arana, D., Nombela, C., & Pla, J. (2006). The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 5(2), 347-358. doi: 10.1128/EC.5.2.347-358.2006
- Ene, I. V., Heilmann, C. J., Sorgo, A. G., Walker, L. A., de Koster, C. G., Munro, C. A., . . . Brown, A. J. (2012). Carbon source-induced reprogramming of the cell wall

- proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Proteomics*, 12(21), 3164-3179. doi: 10.1002/pmic.201200228
- Ericsson, A. C., Hagan, C. E., Davis, D. J., & Franklin, C. L. (2014). Segmented filamentous bacteria: commensal microbes with potential effects on research. *Comparative Medicine*, 64(2), 90-98.
- Ernst, J. F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146 ( Pt 8), 1763-1774.
- Eyerich, K., Foerster, S., Rombold, S., Seidl, H. P., Behrendt, H., Hofmann, H., . . . Traidl-Hoffmann, C. (2008). Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(11), 2640-2645. doi: 10.1038/jid.2008.139
- Feja, K. N., Wu, F., Roberts, K., Loughrey, M., Nesin, M., Larson, E., . . . Saiman, L. (2005). Risk factors for candidemia in critically ill infants: a matched case-control study. *Journal of Pediatrics*, 147(2), 156-161. doi: 10.1016/j.jpeds.2005.02.021
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B., & Fink, G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6339-6346.
- Fernandez-Arenas, E., Bleck, C. K., Nombela, C., Gil, C., Griffiths, G., & Diez-Orejas, R. (2009). *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell Microbiol*, 11(4), 560-589. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01274.x
- Fernandez-Arenas, E., Cabezon, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., & Gil, C. (2007). Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Mol Cell Proteomics*, 6(3), 460-478. doi: 10.1074/mcp.M600210-MCP200
- Fernandez-Arenas, E., Molero, G., Nombela, C., Diez-Orejas, R., & Gil, C. (2004a). Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *Proteomics*, 4(4), 1204-1215. doi: 10.1002/pmic.200300678
- Fernandez-Arenas, E., Molero, G., Nombela, C., Diez-Orejas, R., & Gil, C. (2004b). Low virulent strains of *Candida albicans*: unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics*, 4(10), 3007-3020. doi: 10.1002/pmic.200400929
- Fidel, P. L., Jr. (1999). Host defense against oropharyngeal and vaginal candidiasis: Site-specific differences. *Rev Iberoam Micol*, 16(1), 8-15.
- Filler, S. G. (2006). *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol*, 9(4), 333-339. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.005
- Fleck, C. B., Schobel, F., & Brock, M. (2011). Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol*, 301(5), 400-407. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.04.007
- Fonzi, W. A., & Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, 134(3), 717-728.
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C., & Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology*, 56(2), 397-415. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04557.x
- Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C., & Hube, B. (2003). Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology*, 47(6), 1523-1543.

- Fradin, C., Poulain, D., & Jouault, T. (2000). beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun*, 68(8), 4391-4398.
- Fukata, M., Nakagawa, M., & Kaibuchi, K. (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5), 590-597.
- Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J., & Hostetter, M. K. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science*, 279(5355), 1355-1358.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., & Underhill, D. M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO Journal*, 24(6), 1277-1286. doi: 10.1038/sj.emboj.7600594
- Garber, G. (2001). An overview of fungal infections. *Drugs*, 61 Suppl 1, 1-12.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M., & d'Enfert, C. (2004). *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell*, 3(2), 536-545.
- Garcia-Sanchez, S., Mavor, A. L., Russell, C. L., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, B., & Brown, A. J. (2005). Global roles of Ssn6 in *TUP1*- and *NRG1*-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 16(6), 2913-2925. doi: 10.1091/mbc.E05-01-0071
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., & Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(9), 837-848. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13:9<837::AID-YEA145>3.0.CO;2-T
- Gerami-Nejad, M., Berman, J., & Gale, C. A. (2001). Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. *Yeast*, 18(9), 859-864. doi: 10.1002/yea.738
- Ghaffari, J., Sarvtin, M. T., Hedayati, M. T., Hajheydari, Z., Yazdani, J., & Shokohi, T. (2015). Corrigendum to "Evaluation of *Candida* Colonization and Specific Humoral Responses against *Candida albicans* in Patients with Atopic Dermatitis". *Biomed Res Int*, 2015, 142453. doi: 10.1155/2015/142453
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*, 6(1), e1000713. doi: 10.1371/journal.ppat.1000713
- Ghosh, S., Navarathna, D. H., Roberts, D. D., Cooper, J. T., Atkin, A. L., Petro, T. M., & Nickerson, K. W. (2009). Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun*, 77(4), 1596-1605. doi: 10.1128/IAI.01452-08
- Gil-Bona, A., Parra-Giraldo, C. M., Hernaez, M. L., Reales-Calderon, J. A., Solis, N. V., Filler, S. G., . . . Gil, C. (2015). *Candida albicans* cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host-pathogen interaction. *J Proteomics*, 127(Pt B), 340-351. doi: 10.1016/j.jprot.2015.06.006
- Gil, M. L., & Gozalbo, D. (2009). Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 570-582.
- Gilbertson-Beadling, S., Powers, E. A., Stamp-Cole, M., Scott, P. S., Wallace, T. L., Copeland, J., . . . Poorman, R. (1995). The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis *In vitro* by a non-metalloproteinase-dependent



- mechanism. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 36(5), 418-424. doi: 10.1007/BF00686191
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y., & Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *URA3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Molecular and General Genetics*, 198(2), 179-182.
- Giusani, A. D., Vines, M., & Kumamoto, C. A. (2002). Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics*, 160(4), 1749-1753.
- Goodridge, H. S., Wolf, A. J., & Underhill, D. M. (2009). Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunological Reviews*, 230(1), 38-50. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x
- Gordon, E. M., Douglas, M. C., Jablonski, P., Owen, J. A., Sali, A., & Watts, J. M. (1972). Gastroduodenal hormones and bile-secretion studies in the isolated perfused pig liver. *Surgery*, 72(5), 708-721.
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12), 5547-5551.
- Goto, Y., Panea, C., Nakato, G., Cebula, A., Lee, C., Diez, M. G., . . . Ivanov, I. (2014). Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity*, 40(4), 594-607. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.005
- Gow, N. A., & Gooday, G. W. (1982). Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 128(9), 2187-2194.
- Gow, N. A., & Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*, 15(4), 406-412. doi: 10.1016/j.mib.2012.04.005
- Gow, N. A., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J., & Netea, M. G. (2012). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*, 10(2), 112-122. doi: 10.1038/nrmicro2711
- Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., & Burke, M. D. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(7), 2234-2239. doi: 10.1073/pnas.1117280109
- Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity*, 26(5), 605-616. doi: 10.1016/j.immuni.2007.03.012
- Groneberg, D. A., Grosse-Siestrup, C., & Fischer, A. (2002). *In vitro* models to study hepatotoxicity. *Toxicologic Pathology*, 30(3), 394-399.
- Hall, R. A., De Sordi, L., Maccallum, D. M., Topal, H., Eaton, R., Bloor, J. W., . . . Muhlschlegel, F. A. (2010). CO(2) acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 6(11), e1001193. doi: 10.1371/journal.ppat.1001193
- Han, Y., Morrison, R. P., & Cutler, J. E. (1998). A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect Immun*, 66(12), 5771-5776.
- Han, Y., Ulrich, M. A., & Cutler, J. E. (1999). *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J Infect Dis*, 179(6), 1477-1484. doi: 10.1086/314779

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123-1132. doi: 10.1038/ni1254
- Hasin, N., Cusack, S. A., Ali, S. S., Fitzpatrick, D. A., & Jones, G. W. (2014). Global transcript and phenotypic analysis of yeast cells expressing Ssa1, Ssa2, Ssa3 or Ssa4 as sole source of cytosolic Hsp70-Ssa chaperone activity. *BMC Genomics*, 15, 194. doi: 10.1186/1471-2164-15-194
- Hassan, O. E., Jones, J. H., & Russell, C. (1985). Experimental oral candidal infection and carriage of oral bacteria in rats subjected to a carbohydrate-rich diet and tetracycline treatment. *Journal of Medical Microbiology*, 20(3), 291-298. doi: 10.1099/00222615-20-3-291
- He, Z. X., Chen, J., Li, W., Cheng, Y., Zhang, H. P., Zhang, L. N., & Hou, T. W. (2015). Serological response and diagnostic value of recombinant *Candida* cell wall protein enolase, phosphoglycerate kinase, and beta-glucosidase. *Front Microbiol*, 6, 920. doi: 10.3389/fmicb.2015.00920
- Heilmann, C. J., Sorgo, A. G., Siliakus, A. R., Dekker, H. L., Brul, S., de Koster, C. G., . . . Klis, F. M. (2011). Hyphal induction in the human fungal pathogen *Candida albicans* reveals a characteristic wall protein profile. *Microbiology*, 157(Pt 8), 2297-2307. doi: 10.1099/mic.0.049395-0
- Heim, R., Prasher, D. C., & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26), 12501-12504.
- Helstrom, P. B., & Balish, E. (1979). Effect of oral tetracycline, the microbial flora, and the athymic state on gastrointestinal colonization and infection of BALB/c mice with *Candida albicans*. *Infect Immun*, 23(3), 764-774.
- Henriques, M., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2006). *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(4), 217-226. doi: 10.1080/10408410601023524
- Hermann, H., Hacker, U., Bandlow, W., & Magdolen, V. (1992). pYLZ vectors: *Saccharomyces cerevisiae*/*Escherichia coli* shuttle plasmids to analyze yeast promoters. *Gene*, 119(1), 137-141.
- Hernaez, M. L., Ximenez-Embun, P., Martinez-Gomariz, M., Gutierrez-Blazquez, M. D., Nombela, C., & Gil, C. (2010). Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins *in vivo* by a rapid proteomic approach. *J Proteomics*, 73(7), 1404-1409. doi: 10.1016/j.jprot.2010.02.008
- Hernandez-Santos, N., & Gaffen, S. L. (2012). Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*, 11(5), 425-435. doi: 10.1016/j.chom.2012.04.008
- Hernandez, R., Nombela, C., Diez-Orejas, R., & Gil, C. (2004). Two-dimensional reference map of *Candida albicans* hyphal forms. *Proteomics*, 4(2), 374-382. doi: 10.1002/pmic.200300608
- Hernday, A. D., Lohse, M. B., Fordyce, P. M., Nobile, C. J., DeRisi, J. L., & Johnson, A. D. (2013). Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 90(1), 22-35. doi: 10.1111/mmi.12329
- Herrero de Dios, C., Roman, E., Diez, C., Alonso-Monge, R., & Pla, J. (2013). The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*, 50, 21-32. doi: 10.1016/j.fgb.2012.11.001

- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., . . . Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, 111(Pt 5), 509-547. doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Hickman, M. J., & Winston, F. (2007). Heme levels switch the function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between transcriptional activator and transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*, 27(21), 7414-7424. doi: 10.1128/MCB.00887-07
- Hise, A. G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B. A., Brown, G. D., & Fitzgerald, K. A. (2009). An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*, 5(5), 487-497. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.002
- Hodges, A., Sharrocks, K., Edelmann, M., Baban, D., Moris, A., Schwartz, O., . . . Simmons, A. (2007). Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nature Immunology*, 8(6), 569-577. doi: 10.1038/ni1470
- Hogan, D. A. (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*, 5(4), 613-619. doi: 10.1128/EC.5.4.613-619.2006
- Holland, M. J., & Holland, J. P. (1978). Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, 17(23), 4900-4907.
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268-1273. doi: 10.1126/science.1223490
- Hornby, J. M., Dumitru, R., & Nickerson, K. W. (2004). High phosphate (up to 600 mM) induces pseudohyphal development in five wild type *Candida albicans*. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 119-124.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., . . . Nickerson, K. W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2982-2992. doi: 10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001
- Hoyer, L. L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9(4), 176-180.
- Hoyer, L. L., & Cota, E. (2016). *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. *Front Microbiol*, 7, 280. doi: 10.3389/fmicb.2016.00280
- Huang, G., Srikantha, T., Sahni, N., Yi, S., & Soll, D. R. (2009). CO(2) regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Biol*, 19(4), 330-334. doi: 10.1016/j.cub.2009.01.018
- Huang, G., Wang, H., Chou, S., Nie, X., Chen, J., & Liu, H. (2006). Bistable expression of *WOR1*, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(34), 12813-12818. doi: 10.1073/pnas.0605270103
- Huang, W., Na, L., Fidel, P. L., & Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis*, 190(3), 624-631. doi: 10.1086/422329
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J., & Gow, N. A. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 14(1), 87-99.
- Huffnagle, G. B., & Deepe, G. S. (2003). Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr Opin Microbiol*, 6(4), 344-350.
- Iliev, I. D., Funari, V. A., Taylor, K. D., Nguyen, Q., Reyes, C. N., Strom, S. P., . . . Underhill, D. M. (2012). Interactions between commensal fungi and the C-type

- lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science*, 336(6086), 1314-1317. doi: 10.1126/science.1221789
- Ivanov, I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., . . . Littman, D. R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139(3), 485-498. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033
- Ivanov, I., Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D. B., Sartor, R. B., . . . Littman, D. R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*, 4(4), 337-349. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.009
- Jabet, C., Sprague, E. R., VanDemark, A. P., & Wolberger, C. (2000). Characterization of the N-terminal domain of the yeast transcriptional repressor *TUP1*. Proposal for an association model of the repressor complex *TUP1* x Ssn6. *J Biol Chem*, 275(12), 9011-9018.
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 247-269. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- Jakobs, S., Subramaniam, V., Schonle, A., Jovin, T. M., & Hell, S. W. (2000). EFGP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Letters*, 479(3), 131-135.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today*, 13(1), 11-16. doi: 10.1016/0167-5699(92)90198-G
- Jansons, V. K., & Nickerson, W. J. (1970). Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydospore of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 104(2), 910-921.
- Jayatilake, J. A. (2011). A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. *Mycopathologia*, 171(4), 235-250. doi: 10.1007/s11046-010-9373-7
- Jepson, M. A., Clark, M. A., Simmons, N. L., & Hirst, B. H. (1993). Actin accumulation at sites of attachment of indigenous apathogenic segmented filamentous bacteria to mouse ileal epithelial cells. *Infect Immun*, 61(9), 4001-4004.
- Jiang, H. Q., Bos, N. A., & Cebra, J. J. (2001). Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups. *Infect Immun*, 69(6), 3611-3617. doi: 10.1128/IAI.69.6.3611-3617.2001
- Jillson, O. F., & Nickerson, W. J. (1948). Mutual antagonism between pathogenic fungi; inhibition of dimorphism in *Candida albicans*. *Mycologia*, 40(3), 369-385.
- Joly, S., Ma, N., Sadler, J. J., Soll, D. R., Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2009). Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol*, 183(6), 3578-3581. doi: 10.4049/jimmunol.0901323
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., . . . Scherer, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7329-7334. doi: 10.1073/pnas.0401648101
- Jong, A. Y., Chen, S. H., Stins, M. F., Kim, K. S., Tuan, T. L., & Huang, S. H. (2003). Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, 52(Pt 8), 615-622. doi: 10.1099/jmm.0.05060-0
- Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P. A., Sacchetti, P., Lefebvre, P., . . . Poulain, D. (2003). *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis*, 188(1), 165-172. doi: 10.1086/375784
- Jouault, T., Sarazin, A., Martinez-Esparza, M., Fradin, C., Sendid, B., & Poulain, D. (2009). Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to



- tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*, 11(7), 1007-1015. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01318.x
- Junqueira, J. C. (2012). Models hosts for the study of oral candidiasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 710, 95-105. doi: 10.1007/978-1-4419-5638-5\_10
- Kadosh, D., & Johnson, A. D. (2001). Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 21(7), 2496-2505. doi: 10.1128/MCB.21.7.2496-2505.2001
- Kadosh, D., & Johnson, A. D. (2005). Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell*, 16(6), 2903-2912. doi: 10.1091/mbc.E05-01-0073
- Kamai, Y., Kubota, M., Kamai, Y., Hosokawa, T., Fukuoka, T., & Filler, S. G. (2001). New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(11), 3195-3197. doi: 10.1128/AAC.45.11.3195-3197.2001
- Kebaara, B. W., Langford, M. L., Navarathna, D. H., Dumitru, R., Nickerson, K. W., & Atkin, A. L. (2008). *Candida albicans* TUP1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryot Cell*, 7(6), 980-987. doi: 10.1128/EC.00357-07
- Keleher, C. A., Redd, M. J., Schultz, J., Carlson, M., & Johnson, A. D. (1992). Ssn6-TUP1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell*, 68(4), 709-719.
- Keppler-Ross, S., Noffz, C., & Dean, N. (2008). A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics*, 179(1), 705-710. doi: 10.1534/genetics.108.087080
- Kim, J. W., & Dang, C. V. (2005). Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(3), 142-150. doi: 10.1016/j.tibs.2005.01.005
- Kinneberg, K. M., Bendel, C. M., Jechorek, R. P., Cebelinski, E. A., Gale, C. A., Berman, J. G., . . . Wells, C. L. (1999). Effect of INT1 gene on *Candida albicans* murine intestinal colonization. *Journal of Surgical Research*, 87(2), 245-251. doi: 10.1006/jsre.1999.5755
- Kirsch, D. R., & Whitney, R. R. (1991). Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun*, 59(9), 3297-3300.
- Klaasen, H. L., Koopman, J. P., Poelma, F. G., & Beynen, A. C. (1992). Intestinal, segmented, filamentous bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 8(3-4), 165-180.
- Knoke, M., & Bernhardt, H. (2006). The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses*, 49(4), 283-287. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01237.x
- Koh, A. Y. (2013). Murine models of *Candida* gastrointestinal colonization and dissemination. *Eukaryot Cell*, 12(11), 1416-1422. doi: 10.1128/EC.00196-13
- Koh, A. Y., Kohler, J. R., Cogshall, K. T., Van Rooijen, N., & Pier, G. B. (2008). Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog*, 4(2), e35. doi: 10.1371/journal.ppat.0040035
- Kohatsu, L., Hsu, D. K., Jegalian, A. G., Liu, F. T., & Baum, L. G. (2006). Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol*, 177(7), 4718-4726.
- Kohler, J. R., & Fink, G. R. (1996). *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 13223-13228.

- Kolida, S., Saulnier, D. M., & Gibson, G. R. (2006). Gastrointestinal microflora: probiotics. *Advances in Applied Microbiology*, 59, 187-219. doi: 10.1016/S0065-2164(06)59007-0
- Komachi, K., & Johnson, A. D. (1997). Residues in the WD repeats of *TUP1* required for interaction with alpha2. *Mol Cell Biol*, 17(10), 6023-6028.
- Kozel, T. R., MacGill, R. S., Percival, A., & Zhou, Q. (2004). Biological activities of naturally occurring antibodies reactive with *Candida albicans* mannan. *Infect Immun*, 72(1), 209-218.
- Kriegel, M. A., Sefik, E., Hill, J. A., Wu, H. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2011). Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(28), 11548-11553. doi: 10.1073/pnas.1108924108
- Kuhn, D. M., & Ghannoum, M. A. (2004). *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr Opin Investig Drugs*, 5(2), 186-197.
- Kumamoto, C. A., & Vines, M. D. (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol*, 7(11), 1546-1554. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00616.x
- Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W., Miller, S. M., Lai, M., & Kirsch, D. R. (1987). Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 7(1), 209-217.
- Kvaal, C., Lachke, S. A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., & Soll, D. R. (1999). Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*, 67(12), 6652-6662.
- Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., . . . Linden, A. (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol*, 162(4), 2347-2352.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lamarre, C., Deslauriers, N., & Bourbonnais, Y. (2000). Expression cloning of the *Candida albicans* *CSA1* gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Molecular Microbiology*, 35(2), 444-453.
- Lay, J., Henry, L. K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C. E., & Becker, J. M. (1998). Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun*, 66(11), 5301-5306.
- Leberer, E., Marcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D. Y., & Schroppe, K. (2001). Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 42(3), 673-687.
- Lee, K. L., Buckley, H. R., & Campbell, C. C. (1975). An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 13(2), 148-153.
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., & Mazmanian, S. K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4615-4622. doi: 10.1073/pnas.1000082107
- Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbruck, S., & Ernst, J. F. (1997). Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene*, 192(2), 235-240.

- Levitin, A., & Whiteway, M. (2007). The effect of prostaglandin E2 on transcriptional responses of *Candida albicans*. *Microbiol Res*, 162(3), 201-210. doi: 10.1016/j.micres.2007.02.001
- Levitz, S. M. (2010). Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog*, 6(4), e1000758. doi: 10.1371/journal.ppat.1000758
- Lewis, L. E., Bain, J. M., Lowes, C., Gillespie, C., Rudkin, F. M., Gow, N. A., & Erwig, L. P. (2012). Stage specific assessment of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages identifies cell wall composition and morphogenesis as key determinants. *PLoS Pathog*, 8(3), e1002578. doi: 10.1371/journal.ppat.1002578
- Li, F. Q., Ma, C. F., Shi, L. N., Lu, J. F., Wang, Y., Huang, M., & Kong, Q. Q. (2013). Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. *BMC Infect Dis*, 13, 253. doi: 10.1186/1471-2334-13-253
- Li, W., Hu, X., Zhang, X., Ge, Y., Zhao, S., Hu, Y., & Ashman, R. B. (2011). Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine*, 29(33), 5526-5533. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.030
- Li, X. S., Reddy, M. S., Baev, D., & Edgerton, M. (2003). *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. *J Biol Chem*, 278(31), 28553-28561. doi: 10.1074/jbc.M300680200
- Lindsay, A. K., Deveau, A., Piispanen, A. E., & Hogan, D. A. (2012). Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 11(10), 1219-1225. doi: 10.1128/EC.00144-12
- Lionakis, M. S. (2011). *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence*, 2(6), 521-527. doi: 10.4161/viru.2.6.18520
- Liu, H. (2001). Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 4(6), 728-735.
- Liu, H., Kohler, J., & Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science*, 266(5191), 1723-1726.
- Liu, Y., & Filler, S. G. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell*, 10(2), 168-173. doi: 10.1128/EC.00279-10
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loeberberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), 939-949.
- Lopez-Ribot, J. L., Alloush, H. M., Masten, B. J., & Chaffin, W. L. (1996). Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. *Infect Immun*, 64(8), 3333-3340.
- Lorenz, M. C., Bender, J. A., & Fink, G. R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell*, 3(5), 1076-1087. doi: 10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004
- Lorenz, M. C., & Fink, G. R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 412(6842), 83-86. doi: 10.1038/35083594
- Lowden, S., & Heath, T. (1995). Segmented filamentous bacteria associated with lymphoid tissues in the ileum of horses. *Research in Veterinary Science*, 59(3), 272-274.
- Magee, B. B., & Magee, P. T. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science*, 289(5477), 310-313.
- Magliani, W., Conti, S., de Bernardis, F., Gerloni, M., Bertolotti, D., Mozzoni, P., . . . Polonelli, L. (1997). Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nature Biotechnology*, 15(2), 155-158. doi: 10.1038/nbt0297-155

- Magliani, W., Conti, S., De, B. F., Gerloni, M., Bertolotti, D., Mozzoni, P., . . . Polonelli, L. (1997). Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nat. Biotechnol.*, 15(2), 155-158.
- Maidan, M. M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., . . . Van Dijck, P. (2005). The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 16(4), 1971-1986. doi: 10.1091/mbc.E04-09-0780
- Manning, M., & Mitchell, T. G. (1980). Analysis of cytoplasmic antigens of the yeast and mycelial phases of *Candida albicans* by two-dimensional electrophoresis. *Infect Immun*, 30(2), 484-495.
- Marcil, A., Marcus, D., Thomas, D. Y., & Whiteway, M. (2002). *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect Immun*, 70(11), 6319-6329.
- Marcilla, A., Valentin, E., & Sentandreu, R. (1998). The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *Int Microbiol*, 1(2), 107-116.
- Marchesi, J. R. (2010). Prokaryotic and eukaryotic diversity of the human gut. *Advances in Applied Microbiology*, 72, 43-62. doi: 10.1016/S0065-2164(10)72002-5
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., & Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275(2), 1511-1519.
- Martin, R., Wachtler, B., Schaller, M., Wilson, D., & Hube, B. (2011). Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol*, 301(5), 417-422. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.04.009
- Martinez-Gomariz, M., Perumal, P., Mekala, S., Nombela, C., Chaffin, W. L., & Gil, C. (2009). Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics*, 9(8), 2230-2252. doi: 10.1002/pmic.200700594
- Martinez, J. P., Gil, M. L., Lopez-Ribot, J. L., & Chaffin, W. L. (1998). Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 121-141.
- Matthews, R., & Burnie, J. (2001). Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis. *Curr Opin Investig Drugs*, 2(4), 472-476.
- Matthews, R., Burnie, J., Smith, D., Clark, I., Midgley, J., Conolly, M., & Gazzard, B. (1988). *Candida* and AIDS: evidence for protective antibody. *Lancet*, 2(8605), 263-266.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaisky, A. G., Markelov, M. L., & Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, 17(10), 969-973. doi: 10.1038/13657
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128. doi: 10.4161/viru.22913
- McKenzie, C. G., Koser, U., Lewis, L. E., Bain, J. M., Mora-Montes, H. M., Barker, R. N., . . . Erwig, L. P. (2010). Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun*, 78(4), 1650-1658. doi: 10.1128/IAI.00001-10
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Regadera, J., Gonzalez, M., Diaz-Guerra, T. M., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2000). Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 38(1), 21-28.



- Mesa-Arango, A. C., Rueda, C., Roman, E., Quintin, J., Terron, M. C., Luque, D., . . . Zaragoza, O. (2016a). Cell wall changes in AmB-resistant strains from *Candida tropicalis* and relationship with the immune responses elicited by the host. *Antimicrob Agents Chemother*. doi: 10.1128/AAC.02681-15
- Mesa-Arango, A. C., Rueda, C., Roman, E., Quintin, J., Terron, M. C., Luque, D., . . . Zaragoza, O. (2016b). Cell Wall Changes in Amphotericin B-Resistant Strains from *Candida tropicalis* and Relationship with the Immune Responses Elicited by the Host. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(4), 2326-2335. doi: 10.1128/AAC.02681-15
- Milner, J. D., Brenchley, J. M., Laurence, A., Freeman, A. F., Hill, B. J., Elias, K. M., . . . Douek, D. C. (2008). Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*, 452(7188), 773-776. doi: 10.1038/nature06764
- Miller, M. G., & Johnson, A. D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110(3), 293-302.
- Mitchell, A. P. (1998). Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 1(6), 687-692.
- Mochon, A. B., Jin, Y., Kayala, M. A., Wingard, J. R., Clancy, C. J., Nguyen, M. H., . . . Liu, H. (2010). Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathog*, 6(3), e1000827. doi: 10.1371/journal.ppat.1000827
- Modrzejewska, B., & Kurnatowski, P. (2015). Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol*, 61(1), 3-9.
- Monniot, C., Boisrame, A., Da Costa, G., Chauvel, M., Sautour, M., Bougnoux, M. E., . . . Richard, M. L. (2013). Rbt1 protein domains analysis in *Candida albicans* brings insights into hyphal surface modifications and Rbt1 potential role during adhesion and biofilm formation. *PLoS One*, 8(12), e82395. doi: 10.1371/journal.pone.0082395
- Montagnoli, C., Sandini, S., Bacci, A., Romani, L., & La Valle, R. (2004). Immunogenicity and protective effect of recombinant enolase of *Candida albicans* in a murine model of systemic candidiasis. *Med Mycol*, 42(4), 319-324.
- Montazeri, M., & Hedrick, H. G. (1984). Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1341-1342.
- Monteoliva, L., Martinez-Lopez, R., Pitarch, A., Hernaez, M. L., Serna, A., Nombela, C., . . . Gil, C. (2011). Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition. *J Proteome Res*, 10(2), 502-517. doi: 10.1021/pr100710g
- Moon, R. J., Vrable, R. A., & Broka, J. A. (1975). *In situ* separation of bacterial trapping and killing functions of the perfused liver. *Infect Immun*, 12(2), 411-418.
- Moragues, M. D., Omaetxebarria, M. J., Elguezabal, N., Sevilla, M. J., Conti, S., Polonelli, L., & Ponton, J. (2003). A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities. *Infect Immun*, 71(9), 5273-5279.
- Morrow, B., Ramsey, H., & Soll, D. R. (1994). Regulation of phase-specific genes in the more general switching system of *Candida albicans* strain 3153A. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32(4), 287-294.
- Mulhern, S. M., Logue, M. E., & Butler, G. (2006). *Candida albicans* transcription factor ACE2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryot Cell*, 5(12), 2001-2013. doi: 10.1128/EC.00155-06

- Munro, C. A., Bates, S., Buurman, E. T., Hughes, H. B., Maccallum, D. M., Bertram, G., . . . Gow, N. A. (2005). Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem*, 280(2), 1051-1060. doi: 10.1074/jbc.M411413200
- Murad, A. M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., . . . Brown, A. J. (2001). *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO Journal*, 20(17), 4742-4752. doi: 10.1093/emboj/20.17.4742
- Murciano, C., Moyes, D. L., Runglall, M., Tobouti, P., Islam, A., Hoyer, L. L., & Naglik, J. R. (2012). Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PLoS One*, 7(3), e33362. doi: 10.1371/journal.pone.0033362
- Mylonakis, E., Casadevall, A., & Ausubel, F. M. (2007). Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog*, 3(7), e101. doi: 10.1371/journal.ppat.0030101
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., & Hube, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, 6(10), 915-926. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00439.x
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003a). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(3), 400-428, table of contents.
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003b). *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 400-428. doi: 10.1128/mmbr.67.3.400-428.2003
- Naglik, J. R., Fostira, F., Ruprai, J., Staab, J. F., Challacombe, S. J., & Sundstrom, P. (2006). *Candida albicans* *HWP1* gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 10), 1323-1327. doi: 10.1099/jmm.0.46737-0
- Naglik, J. R., Rodgers, C. A., Shirlaw, P. J., Dobbie, J. L., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, D., . . . Challacombe, S. J. (2003). Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis*, 188(3), 469-479. doi: 10.1086/376536
- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M., & Aoki, Y. (2000). Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun*, 68(12), 6712-6719.
- Narayanan, R., Joyce, W. A., & Greenfield, R. A. (1991). Gastrointestinal candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome. *Infect Immun*, 59(6), 2116-2119.
- Navarro-Garcia, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Pla, J., Sentandreu, R., & Nombela, C. (1998). A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology*, 144 ( Pt 2), 411-424.
- Navarro-Garcia, F., Eisman, B., Fiuza, S. M., Nombela, C., & Pla, J. (2005). The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology*, 151(Pt 8), 2737-2749. doi: 10.1099/mic.0.28038-0
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C., & Pla, J. (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(2), 245-268.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Pla, J., & Nombela, C. (1995). Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-

- activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol*, 15(4), 2197-2206.
- Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J., & Nombela, C. (1997). Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiology*, 143 ( Pt 2), 297-302.
- Netea, M. G., Blok, W. L., Kullberg, B. J., Bemelmans, M., Vogels, M. T., Buurman, W. A., & van der Meer, J. W. (1995). Pharmacologic inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice. *J Infect Dis*, 171(2), 393-399.
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*, 6(1), 67-78. doi: 10.1038/nrmicro1815
- Netea, M. G., Gow, N. A., Joosten, L. A., Verschuere, I., van der Meer, J. W., & Kullberg, B. J. (2010). Variable recognition of *Candida albicans* strains by TLR4 and lectin recognition receptors. *Med Mycol*, 48(7), 897-903. doi: 10.3109/13693781003621575
- Netea, M. G., Gow, N. A., Munro, C. A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., . . . Kullberg, B. J. (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1642-1650. doi: 10.1172/JCI27114
- Netea, M. G., van de Veerdonk, F., Verschuere, I., van der Meer, J. W., & Kullberg, B. J. (2008). Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(1), 118-123. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00353.x
- Nett, J., & Andes, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol*, 9(4), 340-345. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.007
- Nett, J. E., Crawford, K., Marchillo, K., & Andes, D. R. (2010). Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(8), 3505-3508. doi: 10.1128/AAC.00227-10
- Neville, B. A., d'Enfert, C., & Bougnoux, M. E. (2015). *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Res*, 15(7). doi: 10.1093/femsyr/fov081
- Nishiya, C. T., Boxx, G. M., Robison, K., Itatani, C., Kozel, T. R., & Zhang, M. X. (2015). Influence of IgG Subclass on Human Antimannan Antibody-Mediated Resistance to Hematogenously Disseminated Candidiasis in Mice. *Infect Immun*, 84(2), 386-394. doi: 10.1128/IAI.00890-15
- Nobile, C. J., Andes, D. R., Nett, J. E., Smith, F. J., Yue, F., Phan, Q. T., . . . Mitchell, A. P. (2006). Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *In vitro* and *in vivo*. *PLoS Pathog*, 2(7), e63. doi: 10.1371/journal.ppat.0020063
- Nobile, C. J., Nett, J. E., Andes, D. R., & Mitchell, A. P. (2006). Function of *Candida albicans* adhesin *HWP1* in biofilm formation. *Eukaryot Cell*, 5(10), 1604-1610. doi: 10.1128/EC.00194-06
- Nombela, C., Gil, C., & Chaffin, W. L. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol*, 14(1), 15-21. doi: 10.1016/j.tim.2005.11.009
- Odds, F. C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(3 Pt 2), S2-5.
- Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K., & Nakase, T. (1993). Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic Acids Res*, 21(17), 4039-4045.

- Ott, S. J., Kuhbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., . . . Schreiber, S. (2008). Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43(7), 831-841. doi: 10.1080/00365520801935434
- Pachl, J., Svoboda, P., Jacobs, F., Vandewoude, K., van der Hoven, B., Spronk, P., . . . Mycograb Invasive Candidiasis Study, G. (2006). A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 42(10), 1404-1413. doi: 10.1086/503428
- Papadimitriou, J. M., & Ashman, R. B. (1986). The pathogenesis of acute systemic candidiasis in a susceptible inbred mouse strain. *Journal of Pathology*, 150(4), 257-265. doi: 10.1002/path.1711500405
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., Simkin, A. J., Creche, J., & Giglioli-Guivarc'h, N. (2012). Deus ex *Candida* genetics: overcoming the hurdles for the development of a molecular toolbox in the CTG clade. *Microbiology*, 158(Pt 3), 585-600. doi: 10.1099/mic.0.055244-0
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87-103.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., . . . Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, 6(11), 1133-1141. doi: 10.1038/ni1261
- Park, Y. N., & Morschhauser, J. (2005). Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 4(8), 1328-1342. doi: 10.1128/EC.4.8.1328-1342.2005
- Patterson, S. D. (2001). Protein identification and characterization by mass spectrometry. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 10, Unit 10 22. doi: 10.1002/0471142727.mb1022s41
- Payne, P. W., Jr. (2013). Increasing the efficiency of medical research article searching for the public and experts by "shepardizing": a lesson from legal research databases. *Journal of the Medical Library Association*, 101(3), 174-176. doi: 10.3163/1536-5050.101.3.004
- Pietrella, D., Rachini, A., Pandey, N., Schild, L., Netea, M., Bistoni, F., . . . Vecchiarelli, A. (2010). The Inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun*, 78(11), 4754-4762. doi: 10.1128/IAI.00789-10
- Piispanen, A. E., Grahl, N., Hollomon, J. M., & Hogan, D. A. (2013). Regulated proteolysis of *Candida albicans* Ras1 is involved in morphogenesis and quorum sensing regulation. *Molecular Microbiology*, 89(1), 166-178. doi: 10.1111/mmi.12268
- Pitarch, A., Abian, J., Carrascal, M., Sanchez, M., Nombela, C., & Gil, C. (2004). Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics*, 4(10), 3084-3106. doi: 10.1002/pmic.200400903
- Pitarch, A., Diez-Orejas, R., Molero, G., Pardo, M., Sanchez, M., Gil, C., & Nombela, C. (2001). Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics*, 1(4), 550-559. doi: 10.1002/1615-9861(200104)1:4<550::AID-PROT550>3.0.CO;2-W
- Pitarch, A., Jimenez, A., Nombela, C., & Gil, C. (2006). Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics*, 5(1), 79-96. doi: 10.1074/mcp.M500243-MCP200



- Pitarch, A., Jimenez, A., Nombela, C., & Gil, C. (2008). Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics: Clinical Applications*, 2(4), 596-618. doi: 10.1002/prca.200780039
- Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2007). Reliability of antibodies to *Candida* methionine synthase for diagnosis, prognosis and risk stratification in systemic candidiasis: A generic strategy for the prototype development phase of proteomic markers. *Proteomics: Clinical Applications*, 1(10), 1221-1242. doi: 10.1002/prca.200601036
- Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2011). Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-*Candida* antibodies in serum. *Mol Cell Proteomics*, 10(1), M110 004010. doi: 10.1074/mcp.M110.004010
- Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2014). Serum antibody signature directed against *Candida albicans* Hsp90 and enolase detects invasive candidiasis in non-neutropenic patients. *J Proteome Res*, 13(11), 5165-5184. doi: 10.1021/pr500681x
- Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2015). Seroprofiling at the *Candida albicans* protein species level unveils an accurate molecular discriminator for candidemia. *J Proteomics*. doi: 10.1016/j.jprot.2015.10.022
- Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2016). Seroprofiling at the *Candida albicans* protein species level unveils an accurate molecular discriminator for candidemia. *J Proteomics*, 134, 144-162. doi: 10.1016/j.jprot.2015.10.022
- Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., & Gil, C. (2002). Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics*, 1(12), 967-982.
- Pla, J., Perez-Diaz, R. M., Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., & Nombela, C. (1995). Cloning of the *Candida albicans* *HIS1* gene by direct complementation of a *C. albicans* histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene*, 165(1), 115-120.
- Polonelli, L., Casadevall, A., Han, Y., Bernardis, F., Kirkland, T. N., Matthews, R. C., . . . Santoni, G. (2000). The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. *Med Mycol*, 38 Suppl 1, 281-292.
- Polonelli, L., Seguy, N., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Cantelli, C., . . . Cailliez, J. C. (1997). Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4(2), 142-146.
- Porsius, J. C., van Vliet, H. J., van Zeijl, J. H., Goessens, W. H., & Michel, M. F. (1990). Detection of an antibody response in immunocompetent patients with systemic candidiasis or *Candida albicans* colonisation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(5), 352-355.
- Presterl, E., Lassnigg, A., Mueller-Uri, P., El-Menyawi, I., & Graninger, W. (1999). Cytokines in sepsis due to *Candida albicans* and in bacterial sepsis. *European Cytokine Network*, 10(3), 423-430.
- Prieto, D., Carpena, N., Maneu, V., Gil, M. L., Pla, J., & Gozalbo, D. (2016). TLR2 modulates gut colonization and dissemination of *Candida albicans* in a murine model. *Microbes Infect*. doi: 10.1016/j.micinf.2016.05.005
- Prieto, D., & Pla, J. (2015). Distinct stages during colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *Front Microbiol*, 6, 792. doi: 10.3389/fmicb.2015.00792

- Prieto, D., Roman, E., Correia, I., & Pla, J. (2014). The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *PLoS One*, 9(1), e87128. doi: 10.1371/journal.pone.0087128
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., & Posas, F. (2001). Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO Journal*, 20(5), 1123-1133. doi: 10.1093/emboj/20.5.1123
- Rahman, D., & Challacombe, S. J. (1995). Oral immunization against mucosal candidiasis in a mouse model. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 371B, 1663-1666.
- Ralph, P., & Nakoinz, I. (1977). Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J Immunol*, 119(3), 950-954.
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., & Lopez-Ribot, J. L. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*, 4(4), 633-638. doi: 10.1128/EC.4.4.633-638.2005
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5459-5463.
- Ramage, G., VandeWalle, K., Lopez-Ribot, J. L., & Wickes, B. L. (2002). The filamentation pathway controlled by the *EFG1* regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*, 214(1), 95-100.
- Ravetch, J. V., & Clynes, R. A. (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement *in vivo*. *Annu Rev Immunol*, 16, 421-432. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.421
- Reales-Calderon, J. A., Martinez-Solano, L., Martinez-Gomariz, M., Nombela, C., Molero, G., & Gil, C. (2012). Sub-proteomic study on macrophage response to *Candida albicans* unravels new proteins involved in the host defense against the fungus. *J Proteomics*, 75(15), 4734-4746. doi: 10.1016/j.jprot.2012.01.037
- Reeves, E. P., Lu, H., Jacobs, H. L., Messina, C. G., Bolsover, S., Gabella, G., . . . Segal, A. W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*, 416(6878), 291-297. doi: 10.1038/416291a
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L., & Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol*, 29, 163-183. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101345
- Relloso, M., Aragonese-Fenoll, L., Lasarte, S., Bourgeois, C., Romera, G., Kuchler, K., . . . Diez-Orejas, R. (2012). Estradiol impairs the Th17 immune response against *Candida albicans*. *Journal of Leukocyte Biology*, 91(1), 159-165. doi: 10.1189/jlb.1110645
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., & Morschhauser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene*, 341, 119-127. doi: 10.1016/j.gene.2004.06.021
- Richard, M. L., Nobile, C. J., Bruno, V. M., & Mitchell, A. P. (2005). *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell*, 4(8), 1493-1502. doi: 10.1128/EC.4.8.1493-1502.2005
- Rizzetto, L., Kuka, M., De Filippo, C., Cambi, A., Netea, M. G., Beltrame, L., . . . Cavalieri, D. (2010). Differential IL-17 production and mannan recognition contribute to fungal pathogenicity and commensalism. *J Immunol*, 184(8), 4258-4268. doi: 10.4049/jimmunol.0902972
- Roman, E., Alonso-Monge, R., Gong, Q., Li, D., Calderone, R., & Pla, J. (2009). The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen

- Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 9(6), 942-955. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00545.x
- Roman, E., Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., & Pla, J. (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol*, 15(4), 181-190. doi: 10.1016/j.tim.2007.02.001
- Roman, E., Correia, I., Salazin, A., Fradin, C., Jouault, T., Poulain, D., . . . Pla, J. (2016). The Cek1 mediated MAP kinase pathway regulates exposure of alpha1,2 and beta1,2mannosides in the cell wall of *Candida albicans* modulating immune recognition. *Virulence*, 1-20. doi: 10.1080/21505594.2016.1163458
- Roman, E., Nombela, C., & Pla, J. (2005). The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 25(23), 10611-10627. doi: 10.1128/MCB.25.23.10611-10627.2005
- Romani, L. (1999a). Cytokine modulation of specific and nonspecific immunity to *Candida albicans*. *Mycoses*, 42 Suppl 2, 45-48.
- Romani, L. (1999b). Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Curr Opin Microbiol*, 2(4), 363-367. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80064-2
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews: Immunology*, 11(4), 275-288. doi: 10.1038/nri2939
- Romani, L., & Kaufmann, S. H. (1998). Immunity to fungi: editorial overview. *Research in Immunology*, 149(4-5), 277-281.
- Romani, L., Montagnoli, C., Bozza, S., Perruccio, K., Spreca, A., Allavena, P., . . . Puccetti, P. (2004). The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *International Immunology*, 16(1), 149-161.
- Rosenbach, A., Dignard, D., Pierce, J. V., Whiteway, M., & Kumamoto, C. A. (2010). Adaptations of *Candida albicans* for growth in the mammalian intestinal tract. *Eukaryot Cell*, 9(7), 1075-1086. doi: 10.1128/EC.00034-10
- Rubin-Bejerano, I., Fraser, I., Grisafi, P., & Fink, G. R. (2003). Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19), 11007-11012. doi: 10.1073/pnas.1834481100
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E., & Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*, 6(1), 14-29. doi: 10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x
- Saez-Roson, A., Sevilla, M. J., & Moragues, M. D. (2014). Identification of superficial *Candida albicans* germ tube antigens in a rabbit model of disseminated candidiasis. A proteomic approach. *Int Microbiol*, 17(1), 21-29. doi: 10.2436/20.1501.01.204
- Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., . . . Iwakura, Y. (2010). Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity*, 32(5), 681-691. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.001
- Samaranayake, Y. H., & Samaranayake, L. P. (2001). Experimental oral candidiasis in animal models. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 398-429. doi: 10.1128/CMR.14.2.398-429.2001
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual New York Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samonis, G., Kofteridis, D. P., Maraki, S., Alegakis, D., Mantadakis, E., Papadakis, J. A., . . . Falagas, M. E. (2005). Levofloxacin and moxifloxacin increase human gut

- colonization by *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(12), 5189. doi: 10.1128/AAC.49.12.5189.2005
- San-Blas, G., Travassos, L. R., Fries, B. C., Goldman, D. L., Casadevall, A., Carmona, A. K., . . . Gow, N. A. (2000). Fungal morphogenesis and virulence. *Med Mycol*, 38 Suppl 1, 79-86.
- Sano, T., Ozaki, K., Kodama, Y., Matsuura, T., & Narama, I. (2012). Antimicrobial agent, tetracycline, enhanced upper alimentary tract *Candida albicans* infection and its related mucosal proliferation in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicologic Pathology*, 40(7), 1014-1019. doi: 10.1177/0192623312447287
- Saputo, S., Kumar, A., & Krysan, D. J. (2014). *EFG1* directly regulates *ACE2* expression to mediate cross talk between the cAMP/PKA and RAM pathways during *Candida albicans* morphogenesis. *Eukaryot Cell*, 13(9), 1169-1180. doi: 10.1128/EC.00148-14
- Sato, K., Yang, X. L., Yudate, T., Chung, J. S., Wu, J., Luby-Phelps, K., . . . Ariizumi, K. (2006). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem*, 281(50), 38854-38866. doi: 10.1074/jbc.M606542200
- Savage, D. C. (1969). Localization of certain indigenous microorganisms on the ileal villi of rats. *Journal of Bacteriology*, 97(3), 1505-1506.
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Bryant, A. P., Fretzen, A., Monreal, A., Solberg, E. O., . . . Milne, G. T. (2006). Inhibition of filamentation can be used to treat disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(10), 3312-3316. doi: 10.1128/AAC.00628-06
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Chaturvedi, A. K., Monteagudo, C., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). Use of a genetically engineered strain to evaluate the pathogenic potential of yeast cell and filamentous forms during *Candida albicans* systemic infection in immunodeficient mice. *Infect Immun*, 76(1), 97-102. doi: 10.1128/IAI.00982-07
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Chaturvedi, A. K., Monteagudo, C., & Lopez-Ribot, J. L. (2009). Efficacy of a genetically engineered *Candida albicans* tet-*NRG1* strain as an experimental live attenuated vaccine against hematogenously disseminated candidiasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(3), 430-432. doi: 10.1128/CVI.00480-08
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., & Lopez-Ribot, J. L. (2003a). Engineered Control of Cell Morphology *In vivo* Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection. *Eukaryot Cell*, 2(5), 1053-1060. doi: 10.1128/ec.2.5.1053-1060.2003
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., & Lopez-Ribot, J. L. (2003b). Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*, 2(5), 1053-1060.
- Saville, S. P., Thomas, D. P., & Lopez Ribot, J. L. (2006). A role for Efg1p in *Candida albicans* interactions with extracellular matrices. *FEMS Microbiol Lett*, 256(1), 151-158. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00109.x
- Sawyer, R. T., Moon, R. J., & Beneke, E. S. (1976). Hepatic clearance of *Candida albicans* in rats. *Infect Immun*, 14(6), 1348-1355.
- Schaller, M., Januschke, E., Schackert, C., Woerle, B., & Korting, H. C. (2001). Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. *Journal of Medical Microbiology*, 50(8), 743-747. doi: 10.1099/0022-1317-50-8-743
- Schulze, J., & Sonnenborn, U. (2009). Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int*, 106(51-52), 837-842. doi: 10.3238/arztebl.2009.0837



- Sevilla, M. J., Robledo, B., Rementeria, A., Moragues, M. D., & Ponton, J. (2006). A fungicidal monoclonal antibody protects against murine invasive candidiasis. *Infection and Immunity*, 74(5), 3042-3045. doi: 10.1128/IAI.74.5.3042-3045.2006
- Shahana, S., Childers, D. S., Ballou, E. R., Bohovych, I., Odds, F. C., Gow, N. A., & Brown, A. J. (2014). New Clox Systems for rapid and efficient gene disruption in *Candida albicans*. *PLoS One*, 9(6), e100390. doi: 10.1371/journal.pone.0100390
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1567-1572. doi: 10.1038/nbt1037
- Sharkey, L. L., McNemar, M. D., Saporito-Irwin, S. M., Sypherd, P. S., & Fonzi, W. A. (1999). *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *Journal of Bacteriology*, 181(17), 5273-5279.
- Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Phan, Q. T., Fu, Y., Ibrahim, A. S., . . . Edwards, J. E., Jr. (2004). Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 279(29), 30480-30489. doi: 10.1074/jbc.M401929200
- Silva, R. C., Padovan, A. C., Pimenta, D. C., Ferreira, R. C., da Silva, C. V., & Briones, M. R. (2014). Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 66. doi: 10.3389/fcimb.2014.00066
- Simonetti, N., Strippoli, V., & Cassone, A. (1974). Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature*, 250(464), 344-346.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., & Soll, D. R. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 169(1), 189-197.
- Smith, R. L., & Johnson, A. D. (2000). Turning genes off by Ssn6-*TUP1*: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(7), 325-330.
- Sohn, K., Urban, C., Brunner, H., & Rupp, S. (2003). *EFG1* is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Molecular Microbiology*, 47(1), 89-102.
- Soll, D. R. (1986). The regulation of cellular differentiation in the dimorphic yeast *Candida albicans*. *Bioessays*, 5(1), 5-11. doi: 10.1002/bies.950050103
- Soll, D. R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica*, 81(2), 101-110.
- Song, J. L., & White, T. C. (2003). RAM2: an essential gene in the prenylation pathway of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(Pt 1), 249-259.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P., & Ernst, J. F. (1999). Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun*, 67(10), 5514-5517.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., & Ernst, J. F. (2000). Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 35(2), 386-396.
- Sosinska, G. J., de Koning, L. J., de Groot, P. W., Manders, E. M., Dekker, H. L., Hellingwerf, K. J., . . . Klis, F. M. (2011). Mass spectrometric quantification of the adaptations in the wall proteome of *Candida albicans* in response to ambient pH. *Microbiology*, 157(Pt 1), 136-146. doi: 10.1099/mic.0.044206-0

- Spellberg, B. J., Filler, S. G., & Edwards, J. E., Jr. (2006). Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 42(2), 244-251. doi: 10.1086/499057
- Spellberg, B. J., Ibrahim, A. S., Avanesian, V., Fu, Y., Myers, C., Phan, Q. T., . . . Edwards, J. E., Jr. (2006). Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *J Infect Dis*, 194(2), 256-260. doi: 10.1086/504691
- Srikantha, T., Chandrasekhar, A., & Soll, D. R. (1995). Functional analysis of the promoter of the phase-specific *WH11* gene of *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 15(3), 1797-1805.
- Srikantha, T., Klapach, A., Lorenz, W. W., Tsai, L. K., Laughlin, L. A., Gorman, J. A., & Soll, D. R. (1996). The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 178(1), 121-129.
- Srinivasa, K., Kim, J., Yee, S., Kim, W., & Choi, W. (2012). A MAP kinase pathway is implicated in the pseudohyphal induction by hydrogen peroxide in *Candida albicans*. *Mol Cells*, 33(2), 183-193. doi: 10.1007/s10059-012-2244-y
- Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L., & Sundstrom, P. (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* *HWP1*. *Science*, 283(5407), 1535-1538.
- Staab, J. F., Ferrer, C. A., & Sundstrom, P. (1996). Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 271(11), 6298-6305.
- Staab, J. F., & Sundstrom, P. (1998). Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene *HWP1* of *Candida albicans*. *Yeast*, 14(7), 681-686. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199805)14:7<681::AID-YEA256>3.0.CO;2-8
- Staab, J. F., & Sundstrom, P. (2003). *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol*, 11(2), 69-73.
- Staib, P., & Morschhauser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50(1), 1-12. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x
- Steinman, R. M. (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*, 30, 1-22. doi: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839
- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E., & Ernst, J. F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO Journal*, 16(8), 1982-1991. doi: 10.1093/emboj/16.8.1982
- Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 12(7), 317-324. doi: 10.1016/j.tim.2004.05.008
- Sun, J. N., Li, W., Jang, W. S., Nayyar, N., Sutton, M. D., & Edgerton, M. (2008). Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by *Candida albicans* Ssa2p requires binding to non-conventional sites within the ATPase domain. *Molecular Microbiology*, 70(5), 1246-1260.
- Sun, J. N., Solis, N. V., Phan, Q. T., Bajwa, J. S., Kashleva, H., Thompson, A., . . . Filler, S. G. (2010). Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog*, 6(11), e1001181. doi: 10.1371/journal.ppat.1001181
- Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., . . . Takada, H. (2002). *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived

- mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiology and Immunology*, 46(7), 503-512.
- Tansho, S., Abe, S., Ishibashi, H., Mitsuya, M., Wada, K., Ikeda, T., . . . Yamaguchi, H. (2004). Production of anti-*Candida* antibodies in mice with gut colonization of *Candida albicans*. *Mediators Inflamm*, 13(3), 189-193. doi: 10.1080/09511920410001713510
- Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A., & Ernst, J. F. (2003). Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene. *Journal of Molecular Biology*, 329(5), 949-962.
- ten Cate, J. M., Klis, F. M., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W., & de Groot, P. W. (2009). Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *Journal of Dental Research*, 88(2), 105-115. doi: 10.1177/0022034508329273
- Thewes, S., Reed, H. K., Grosse-Siestrup, C., Groneberg, D. A., Meissler, M., Schaller, M., & Hube, B. (2007). Haemoperfused liver as an *ex vivo* model for organ invasion of *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 2), 266-270. doi: 10.1099/jmm.0.46760-0
- Turner, M. W., & Hamvas, R. M. (2000). Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Reviews in Immunogenetics*, 2(3), 305-322.
- Uhl, M. A., & Johnson, A. D. (2001). Development of *Streptococcus thermophilus* lacZ as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology*, 147(Pt 5), 1189-1195. doi: 10.1099/00221287-147-5-1189
- Umazume, M., Ueta, E., & Osaki, T. (1995). Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 432-439.
- Urrialde, V., Prieto, D., Pla, J., & Alonso-Monge, R. (2015). The Pho4 transcription factor mediates the response to arsenate and arsenite in *Candida albicans*. *Front Microbiol*, 6, 118. doi: 10.3389/fmicb.2015.00118
- Urrialde, V., Prieto, D., Pla, J., & Alonso-Monge, R. (2016). The *Candida albicans* Pho4 transcription factor mediates susceptibility to stress and influences fitness in a mouse commensalism model. . *Frontiers in Microbiology, section Fungi and Their Interactions*.
- van de Veerdonk, F. L., Marijnissen, R. J., Kullberg, B. J., Koenen, H. J., Cheng, S. C., Joosten, I., . . . Netea, M. G. (2009). The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*, 5(4), 329-340. doi: 10.1016/j.chom.2009.02.006
- van Deventer, H. J., Goessens, W. H., van Vliet, A. J., & Verbrugh, H. A. (1996). Anti-enolase antibodies partially protective against systemic candidiasis in mice. *Clinical Microbiology and Infection*, 2(1), 36-43.
- Vautier, S., Drummond, R. A., Chen, K., Murray, G. I., Kadosh, D., Brown, A. J., . . . Brown, G. D. (2015). *Candida albicans* colonization and dissemination from the murine gastrointestinal tract: the influence of morphology and Th17 immunity. *Cell Microbiol*, 17(4), 445-450. doi: 10.1111/cmi.12388
- Vazquez-Torres, A., & Balish, E. (1997). Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(2), 170-192.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., & Balish, E. (1995). Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. *Infect Immun*, 63(3), 1142-1144.

- Vellucci, V. F., Gygax, S. E., & Hostetter, M. K. (2007). Involvement of *Candida albicans* pyruvate dehydrogenase complex protein X (Pdx1) in filamentation. *Fungal Genet Biol*, 44(10), 979-990. doi: 10.1016/j.fgb.2006.12.003
- Vialas, V., Perumal, P., Gutierrez, D., Ximenez-Embun, P., Nombela, C., Gil, C., & Chaffin, W. L. (2012). Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. *Proteomics*, 12(14), 2331-2339. doi: 10.1002/pmic.201100588
- Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., . . . Investigators, E. I. G. o. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 302(21), 2323-2329. doi: 10.1001/jama.2009.1754
- Vyas, V. K., Barrasa, M. I., & Fink, G. R. (2015). A CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci Adv*, 1(3), e1500248. doi: 10.1126/sciadv.1500248
- Vylkova, S., & Lorenz, M. C. (2014). Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport. *PLoS Pathog*, 10(3), e1003995. doi: 10.1371/journal.ppat.1003995
- Wachtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., & Hube, B. (2011). From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One*, 6(2), e17046. doi: 10.1371/journal.pone.0017046
- Weis, C., Kappe, R., & Sonntag, H. G. (1997). Western blot analysis of the immune response to *Candida albicans* antigens in 391 long-term intensive care patients. *Mycoses*, 40(5-6), 153-157.
- Wheeler, R. T., & Fink, G. R. (2006). A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog*, 2(4), e35. doi: 10.1371/journal.ppat.0020035
- Wheeler, R. T., Kombe, D., Agarwala, S. D., & Fink, G. R. (2008). Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS Pathog*, 4(12), e1000227. doi: 10.1371/journal.ppat.1000227
- Whiteway, M., & Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, 61, 529-553. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093341
- Wiesner, S. M., Jechorek, R. P., Garni, R. M., Bendel, C. M., & Wells, C. L. (2001). Gastrointestinal colonization by *Candida albicans* mutant strains in antibiotic-treated mice. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(1), 192-195. doi: 10.1128/CDLI.8.1.192-195.2001
- Wightman, R., Bates, S., Amornrattanapan, P., & Sudbery, P. (2004). In *Candida albicans*, the Nim1 kinases Gin4 and Hsl1 negatively regulate pseudohypha formation and Gin4 also controls septin organization. *Journal of Cell Biology*, 164(4), 581-591. doi: 10.1083/jcb.200307176
- Wilkins, A. S. (1995). Variation in the human genome. 12-15 June, 1995. CIBA Foundation symposium 197, London, UK. *Bioessays*, 17(10), 905-906. doi: 10.1002/bies.950171013
- Wilson, D., Mayer, F. L., Miramon, P., Citiulo, F., Slesiona, S., Jacobsen, I. D., & Hube, B. (2014). Distinct roles of *Candida albicans*-specific genes in host-pathogen interactions. *Eukaryot Cell*, 13(8), 977-989. doi: 10.1128/EC.00051-14
- Wilson, D., Thewes, S., Zakikhany, K., Fradin, C., Albrecht, A., Almeida, R., . . . Hube, B. (2009). Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. *FEMS Yeast Res*, 9(5), 688-700. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00524.x
- Williams, D. W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., & Lewis, M. A. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55(1), 250-265. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x



- Williams, F. E., & Trumbly, R. J. (1990). Characterization of *TUP1*, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 10(12), 6500-6511.
- Willment, J. A., & Brown, G. D. (2008). C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol*, 16(1), 27-32. doi: 10.1016/j.tim.2007.10.012
- Xin, H., & Cutler, J. E. (2011). Vaccine and monoclonal antibody that enhance mouse resistance to candidiasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(10), 1656-1667. doi: 10.1128/CVI.05215-11
- Xin, H., Dziadek, S., Bundle, D. R., & Cutler, J. E. (2008). Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(36), 13526-13531. doi: 10.1073/pnas.0803195105
- Yamaguchi, N., Sonoyama, K., Kikuchi, H., Nagura, T., Aritsuka, T., & Kawabata, J. (2005). Gastric colonization of *Candida albicans* differs in mice fed commercial and purified diets. *Journal of Nutrition*, 135(1), 109-115.
- Yan, L., Yang, C., & Tang, J. (2013). Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res*, 168(7), 389-395. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.008
- Yin, J., Zhang, X. X., Wu, B., & Xian, Q. (2015). Metagenomic insights into tetracycline effects on microbial community and antibiotic resistance of mouse gut. *Ecotoxicology*, 24(10), 2125-2132. doi: 10.1007/s10646-015-1540-7
- Yokogawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Mori, M., Ohama, T., Kuchino, Y., . . . et al. (1992). Serine tRNA complementary to the nonuniversal serine codon CUG in *Candida cylindracea*: evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(16), 7408-7411.
- Yrjanheikki, J., Tikka, T., Keinanen, R., Goldsteins, G., Chan, P. H., & Koistinaho, J. (1999). A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23), 13496-13500.
- Zakikhany, K., Naglik, J. R., Schmidt-Westhausen, A., Holland, G., Schaller, M., & Hube, B. (2007). *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol*, 9(12), 2938-2954. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01009.x
- Zaragoza, O., Blazquez, M. A., & Gancedo, C. (1998). Disruption of the *Candida albicans* *TPS1* gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3809-3815.
- Zelante, T., Pieraccini, G., Scaringi, L., Aversa, F., & Romani, L. (2016). Learning from other diseases: protection and pathology in chronic fungal infections. *Seminars in Immunopathology*, 38(2), 239-248. doi: 10.1007/s00281-015-0523-3
- Zhang, H., Jia, C., Xi, H., Li, S., Yang, L., & Wang, Y. (2011). Specific inhibition of *Candida albicans* growth *In vitro* by antibodies from experimental *Candida* keratitis mice. *Experimental Eye Research*, 93(1), 50-58. doi: 10.1016/j.exer.2011.04.010
- Zhao, X., Oh, S. H., & Hoyer, L. L. (2007). Deletion of *ALS5*, *ALS6* or *ALS7* increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Med Mycol*, 45(5), 429-434. doi: 10.1080/13693780701377162
- Zheng, X., Wang, Y., & Wang, Y. (2004). Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO Journal*, 23(8), 1845-1856. doi: 10.1038/sj.emboj.7600195
- Zordan, R. E., Galgoczy, D. J., & Johnson, A. D. (2006). Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining

transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(34), 12807-12812.  
doi: 10.1073/pnas.0605138103

Zordan, R. E., Miller, M. G., Galgoczy, D. J., Tuch, B. B., & Johnson, A. D. (2007).  
Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in  
*Candida albicans*. *PLoS Biol*, 5(10), e256. doi: 10.1371/journal.pbio.0050256